Untersuchungen an Ocimum viride Willd.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

ORTRUN SANDER

aus Dortmund

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Untersuchungen an Ocimum viride Willd.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

ORTRUN SANDER

aus Dortmund

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 7. 2. 1979
Tag der mündlichen Prüfung : 7. 2. 1979
Berichterstatter : Prof. Dr. H.-H. Otto
Mitberichterstatter : Prof. Dr. M. Wichtl

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Pharmazeutische Chemie
und Lebensmittelchemie der Philipps-
Universität Marburg/Lahn auf Anregung
und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. H.-H. Otto

Für seine großzügige Unterstützung
und seinen stets hilfreichen Rat
möchte ich ihm an dieser Stelle
herzlich danken.

Dem Lande Hessen danke ich für die
Gewährung eines Stipendiums.

Meinen Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0018

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Die zu untersuchende Pflanze	2
1.	Bestimmung und systematische Stellung	2
2.	Untersuchung von Inhaltsstoffen	5
2.1.	Allgemeiner Überblick	5
2.2.	Untersuchung von phenolischen Inhaltsstoffen	6
2.2.1.	Begründung	6
2.2.2.	Untersuchung von Hydroxyzimtsäurederivaten	9
2.2.2.1.	Gewinnung des Pflanzenmaterials	9
2.2.2.2.	Dünnschichtchromatographische Untersuchung	9
2.2.2.3.	Pharmakologische Untersuchung	11
2.2.3.	Untersuchung von Flavonoiden	14
2.2.3.1.	Qualitative Nachweisreaktion	14
2.2.3.2.	Isolierung von Flavon 1	20
2.2.3.2.1.	Präparative Papierchromatographie	20
2.2.3.3.	Strukturaufklärung von Flavon 1	21
2.2.3.3.1.	UV-spektroskopische Untersuchung	21
2.2.3.2.2.	Säulenchromatographie	27
2.2.3.3.2.	IR-spektroskopische Untersuchung	30
2.2.3.3.3.	Massenspektrometrische Untersuchung	31

Seite

2.2.3.4. Strukturvorschlag von Flavon 1 35

2.2.3.3.4. ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung 36

2.2.3.3.5. ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchung 37

2.2.3.5. Isolierung von Flavon 10 41

2.2.3.5.1. Umkehrphasenchromatographie 41

2.2.3.6. Strukturaufklärung von Flavon 10 44

2.2.3.6.1. UV-spektroskopische Untersuchung 44

2.2.3.6.2. IR-spektroskopische Untersuchung 48

2.2.3.6.3. Massenspektrometrische Untersuchung 49

2.2.3.6.4. ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung 51

2.2.3.7. Strukturvorschlag von Flavon 10 53

2.2.3.6.5. Vergleichende Untersuchungen mit synthetisiertem Flavon 10a 54

2.2.3.6.5.1. Synthese von Flavon 10a 54

2.2.3.6.5.2. Vergleich der IR-Spektren 59

2.2.3.6.5.3. Diskussion der ^{1}H-NMR-Spektren 60

2.2.3.6.5.4. Diskussion der ^{13}C-NMR-Spektren 63

2.2.3.8. Vorkommen weiterer Flavone 67

2.2.3.9. Quantitative Bestimmung 68

2.2.3.10. Literaturangaben zu den isolierten Flavonen 69

2.2.3.11. Pharmakologische Untersuchung 72

III. Zusammenfassung 74

IV. Literaturverzeichnis 108

Experimenteller Teil

	Seite
Allgemeine Bemerkungen	79
Herkunft und Anbau der untersuchten Pflanzen	81
Ernte und Trocknung	81
Herstellung der Extrakte	81
Nachweisreaktionen zur qualitativen Analyse der Droge	83
Prüflösungen für die pharmakologische Untersuchung	86
Dünnschichtchromatographische Trennung von Hydroxyzimtsäuren	88
Zweidimensionale Papierchromatographie des Flavonoidgemisches	89
Anreicherung von Flavonoiden durch präparative Papierchromatographie	89
Isolierung von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon durch Säulenchromatographie	90
Isolierung von 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon durch Umkehrphasenchromatographie	91
UV-Absorptionsmessung der Flavone	92
Quantitative Bestimmung der Flavonoide	93
Experimentelle Daten des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1	94

Seite

Synthese des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons 10a 96

2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon 2 96

2,5-Dihydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon 3 97

2-Hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenon 4 98

4-Benzyloxybenzoesäure 5a 98

2-(4'-Benzyloxybenzoyloxy)-4,5,6-trimethoxy-acetophenon 6 99

ω-(4'-Benzyloxybenzoyl)-2-hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenon 7 100

4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxyflavon 8 101

4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-D-flavon 8a 102

4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavon 9 103

4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon 9a 104

5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10a 105

Experimentelle Daten des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons 10 106

Theoretischer Teil

I. Einleitung

Im Jahre 1969 breitete sich in Togo eine bis dahin vermutlich noch unbekannte Form von "acute haemorrhagic conjunctivitis" (A.H.C.) epidemieartig aus, die seit dieser Zeit jährlich zu Beginn der Regenfälle einen Teil der afrikanischen Bevölkerung befällt. 1970 und 1971 trat auch in Südostasien und Japan diese blutige Bindehautentzündung zum ersten Mal auf [1]. R. Kono und Mitarbeiter [2] stellten fest, daß es sich bei dem Erreger der Infektionskrankheit um einen Enterovirus handelt, und gaben ihm 1973 die Bezeichnung Enterovirus Typ 70.

Der damalige Leiter der Augenklinik in Lomé (Togo), Dr. Trojan, berichtete in einer privaten Mitteilung, daß die einheimische Bevölkerung gute Heilerfolge mit einer dort wachsenden Pflanze erzielt, indem sie deren Blätter zwischen den Fingern zerreibt und den dabei gebildeten Saft in das erkrankte Auge träufelt. Ihm selbst hingegen mißlang jeglicher Versuch, das Krankheitsbild zu verbessern oder die Krankheitsdauer zu verkürzen, da der Einsatz bekannter Chemotherapeutika bislang nur bei durch Bakterien hervorgerufenen Infektionen zum Erfolg führt, nicht aber bei Viruserkrankungen. Die Entwicklung von Verbindungen, die das Wachstum allein des Virus unterbinden, ohne dabei gleichzeitig die Wirtszelle zu schädigen, bereitet noch große Schwierigkeiten.

Von großem Interesse sollte es deshalb sein, die Wirksamkeit dieser Pflanze gegenüber dem Enterovirus zu erforschen, die möglicherweise von einem chemisch genau definierten

Inhaltsstoff hervorgerufen wird, vielleicht aber auch auf dem Zusammenwirken mehrerer Stoffe beruht, zumal die mündlich überlieferte Beobachtung von Trojan in französischen Literaturstellen Bestätigung findet, in denen auf die beschleunigte Heilung der Augenerkrankung durch diesen Pflanzensaft hingewiesen wird [3,4,5].

II. Die zu untersuchende Pflanze

1. Bestimmung und systematische Stellung

Die von Trojan in Togo gesammelten Samen dieser Pflanze wurden in Frühbeeten des Marburger Botanischen Gartens ausgesät. Die blühende Pflanze wurde als Ocimum viride bestimmt [6,7].

Die zur Familie der Lamiaceae gehörende Gattung Ocimum umfaßt etwa sechzig vornehmlich in den Tropen Afrikas und Asiens heimische Arten, von denen Ocimum basilicum L. als Gewürz und Ocimum camum Sims als Kampferlieferant größere Bedeutung erlangt haben.

Herrn Gartenmeister G. Reichstein danke ich für die sorgsame Anzucht der Pflanzen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Seidel für die gewissenhafte systematische Bestimmung der Pflanze. Exemplare von Ocimum viride sind im Herbarium des Marburger Botanischen Gartens hinterlegt.

Ocimum viride Willd., aufgenommen in Lomé (Togo)

Nach Engler und Prantl [8] wird die Gattung Ocimum in die Untergattungen Hierocimum, Ocimodon und Gymnocimum unterteilt (vgl. Abb. 1). Die Untergattung Ocimodon umfaßt die Subsectionen Basilica Briq., Hiantia Benth. sowie Gratissima Benth., wobei die letztere sich in die Arten Ocimum gratissimum L., Ocimum viride Willd. und Ocimum suave Willd. gliedert. In der systematischen Ordnung von Hutchinson und Dalziel [9] hingegen gelten Ocimum gratissimum und Ocimum viride als Synonyme.

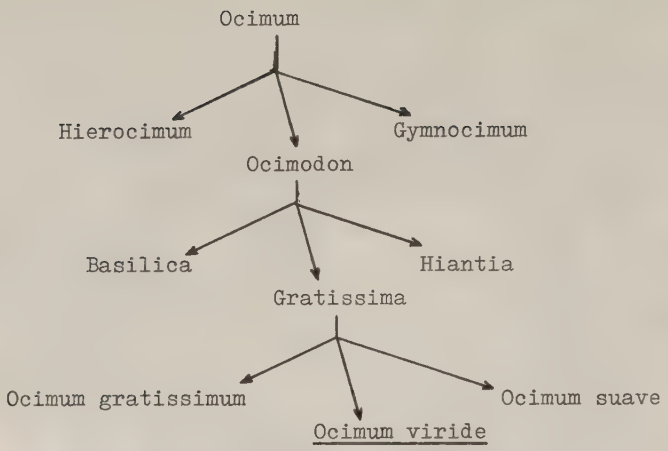


Abb. 1 : Systematische Stellung von Ocimum viride Willd. nach Engler und Prantl

Die morphologischen Unterschiede zwischen Ocimum gratissimum und Ocimum viride sind geringfügig. Während Ocimum gratissimum eine Pflanzenhöhe von einem Meter und mehr erreichen soll, bleibt Ocimum viride niedriger im Wachstum (etwa 60 - 70 cm) und bildet kleinere und schmalere Blätter aus. Gemeinsam ist beiden Mehrjährigkeit und starke Dichotomie.

2. Untersuchung von Inhaltsstoffen

2.1. Allgemeiner Überblick

Um die bereits erwähnte, pharmakologisch recht bedeutsam wirkende Eigenschaft von Ocimum viride näher ergründen zu können, erschien es sinnvoll, zunächst einen allgemeinen Überblick über die in der Pflanze vorkommenden Stoffgruppen zu gewinnen.

Als Grundlage zur qualitativen Analyse dienten die von Wichtl [10] zusammengestellten Nachweisreaktionen. Für die Untersuchungen wurde feingepulverte Droge verwendet.

Die Anwesenheit von Saponinen wurde durch Entstehen eines beständigen Schaums bei der Schüttelprobe und vollständige Hämolyse der zugesetzten roten Blutkörperchen angezeigt. Niederschlagsbildung bei Zugabe von Bleiacetat oder Strychninnitrat zum wäßrigen Drogenauszug wies auf das Vorliegen von Gerbstoffen hin. Auch die Prüfung auf Flavonoide (vgl. S. 17) verlief positiv. Dagegen fiel die Untersuchung auf Alkaloide negativ aus. Nach Erwärmen der Droge mit verdünnter Salzsäure riefen weder Mayers Reagenz, noch Jodlösung, noch Dragendorffs Reagenz eine Fällung hervor. Die Ausbildung von Bitterstoffen wurde aufgrund des außerordentlich bitteren Geschmacks der wäßrigen Prüflösung vermutet. Wie für eine Lamiaceae nicht verwunderlich, führt Ocimum viride ätherisches Öl, dessen eindringlicher Geruch auf Thymol als Bestandteil schließen läßt. Bei der quantitativen Bestimmung des ätherischen Öls durch Wasserdampf-Rücklaufdestillation nach DAB 7 [11] wurde ein Gehalt von 0,5 ml/100 g ermittelt.

2.2. Untersuchung von phenolischen Inhaltsstoffen

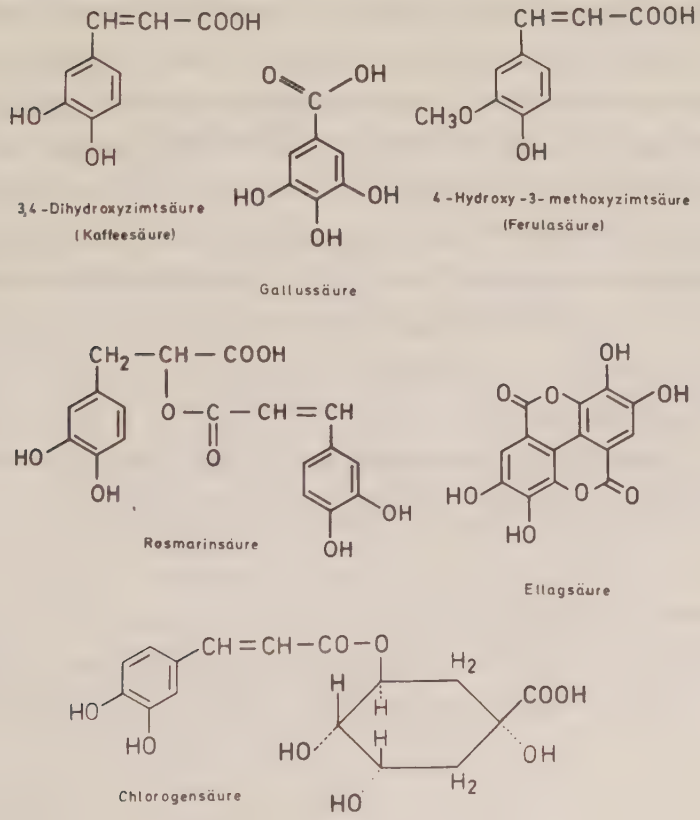
2.2.1. Begründung

Zur Einschränkung der zahlreichen Möglichkeiten, in denen das wirksame Prinzip von Ocimum viride begründet liegen könnte, sollte es unerläßlich sein, Pflanzenextrakte weitgehend definierter Zusammensetzung an den Erkrankten selbst oder zumindest an ausgewählten Virusstämmen in Versuchsreihen zu erproben, um durch gezielte Variation der Prüflösungen die wirksame Komponente einzukreisen und schließlich zu identifizieren. Unglücklicherweise gab Trojan schon kurz nach Beginn der Extraktionsarbeiten seine Tätigkeit in Lomé aus privaten Gründen auf, so daß eine Erprobung der gewonnenen Fraktionen am akuten Krankheitsfall nicht durchführbar war. Auch konnte selbst durch Kontaktaufnahme mit dem sich sehr interessiert zeigenden Direktor des "National Institute of Health" Dr. Kono in Tokio und Prof. Desmyter, Virologe am Rega Institut in Leuven, keine Möglichkeit gefunden werden, an geeigneten Virusstämmen die Wirksamkeit zu überprüfen.

Schon aus der Volksmedizin her ist bekannt, daß zahlreiche Lamiaceenarten wundheilende und entzündungswidrige Eigenschaften bei zum Beispiel Mundhöhlenentzündungen (Salvia, Lamium u.a.) oder Magen-Darmkrankheiten (Thymus, Mentha u.a.) besitzen. Meist sind Gerbstoffe und ätherisches Öl führende Drogen zur Behandlung derartiger Erkrankungen besonders geeignet[12)].

Fällungsreaktionen mit Gelatine und Bleiacetat und Adsorption an Hautpulver lassen erkennen, daß viele Gattungen der Lamiaceae gerbstoffähnliche Substanzen ausbilden. Über Zusammensetzung und Struktur dieser sogenannten "Lamiaceengerbstoffe" findet man in der Literatur keine eindeutigen Aussagen. Von den klassischen Gerbstoffen unterscheiden sie sich durch ihren stark sauren Charakter[13] und spalten bei der Hydrolyse nicht Gallussäure sondern 3,4-Dihydroxyzimtsäure ab[14] (vgl. Schema 1).

Schema 1



Catechine, Ellag- und Gallussäure konnten bislang in der Familie der Lamiaceae nicht nachgewiesen werden [15]. Mit ziemlicher Sicherheit darf man annehmen, daß es sich bei den Lamiaceengerbstoffen um Phenolverbindungen handelt, vornehmlich um Hydroxyzimtsäuren, deren Abkömmlinge und Flavonoide.

Kennzeichnende Hydroxysäuren der Lamiaceae sind die 3,4-Dihydroxyzimtsäure und deren Derivate, wie zum Beispiel Chlorogen-, Isochlorogen-, Rosmarin- und Ferulasäure [16] (vgl. Schema 1).

In neuerer Zeit berichten Cohen, Kucera und Herrmann [17] über antivirale Eigenschaften von Lamiaceen. In einer Reihe von Versuchen überprüften sie die Wirksamkeit wäßriger Extrakte von Melissa officinalis gegenüber Pocken-, Mumps-, Influenza- und anderen Viren. Zu den Pflanzenauszügen gaben sie Gelatinelösung, wodurch die oben beschriebenen Lamiaceengerbstoffe zumindest weitgehend gefällt wurden. Die überstehende Lösung zeigte kaum noch antivirale Aktivität, während die an Gelatine gebundenen Inhaltsstoffe nach Desorption mit Trypsin auf einige Virusstämme eine deutlich hemmende Wirkung ausübten. Offensichtlich besitzen also diese gerbstoffähnlichen Polyphenole neben antidiarrhoischen und entzündungswidrigen auch virustatische Eigenschaften.

2.2.2. Untersuchung von Hydroxyzimtsäurederivaten

In Anlehnung an diese pharmakologisch interessanten Ergebnisse bot es sich an, die phenolischen Inhaltsstoffe von Ocimum viride näher zu untersuchen, beginnend mit den Hydroxyzimtsäuren.

2.2.2.1. Gewinnung des Pflanzenmaterials

Die für die Auszüge verwendete Droge wurde wie das gesamte Untersuchungsmaterial aus einheitlichem, aus Togo stammendem Saatgut im Marburger Botanischen Garten in Frühbeeten gezogen. Dieser Standortwechsel, der möglicherweise eine Veränderung im Gehalt der Inhaltsstoffe zur Folge hatte, mußte in Kauf genommen werden, da mit ausreichendem und regelmäßigem Nachschub von Pflanzen aus Togo selbst nicht gerechnet werden konnte. Nach der Ernte wurde die Droge im Trockenschrank unter Luftumwälzung bei 35 ^{o}C getrocknet und in einer Drogenmühle unter Wasserkühlung pulverisiert.

2.2.2.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Neben einem nach DAB 7 zubereiteten Aufguß (im folgenden als Extrakt a bezeichnet) wurde ein mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur mehrere Tage unter Rühren hergestellter Pflanzenauszug (Extrakt b) - zur Abtrennung von Begleitstoffen über eine Polyamidsäule gegeben - auf

Kieselgel 60 F_{254} dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Vergleichssubstanzen standen 3,4-Dihydroxyzimtsäure, 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure, Chlorogen- und Isochlorogensäure zur Verfügung; als Laufmittelgemische dienten die nachfolgenden Systeme, mit denen man nach Egger [18] gute Trennungen von Phenolcarbonsäuren erzielt:

I) Toluol/Chloroform/Aceton (40:25:35)

II) Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10)

III) Benzol/Dioxan/Eisessig (90:25:4)

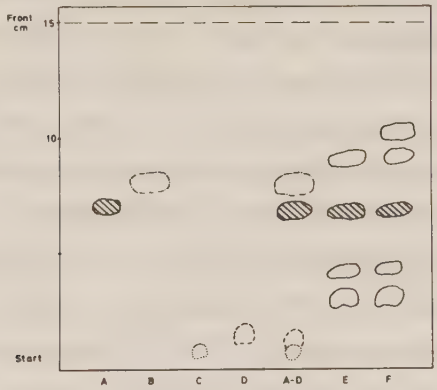


Abb. 2 : Dünnschichtchromatogramm einiger Hydroxyzimtsäuren

A = 3,4-Dihydroxyzimtsäure
B = 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure
C = Chlorogensäure
D = Isochlorogensäure
E = Extrakt a
F = Extrakt b
Schicht: Kieselgel 60 F_{254}
Fließmittel: Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10)
Detektion: UV-Licht bei 365 nm (Behandlung mit Ammoniak)

Aus übereinstimmenden hRF-Werten in allen drei genannten Fließmitteln und gleichartiger hellblauer Fluoreszenz im UV-Licht bei 365 nm vor und nach Behandlung mit Ammoniakdämpfen geht hervor, daß Ocimum viride 3,4-Dihydroxyzimtsäure in nachweisbarer Konzentration führt (vgl. Abb. 2). Ferula-, Chlorogen- und Isochlorogensäure sind dagegen in den Auftrennungen der Pflanzenauszüge nicht aufzufinden.

Bei der Auswertung der Chromatogramme ist darauf zu achten, daß sie unmittelbar erfolgt, da Substanzen mit ortho-Dihydroxygruppen auf trockener Schicht leicht oxidiert werden, wobei Braunfärbung eintritt [18].

2.2.2.3. Pharmakologische Untersuchung

Aufgrund des Vorhandenseins von 3,4-Dihydroxyzimtsäure, dem wohl bedeutendsten Baustein der Lamiaceengerbstoffe [15], wurden Extrakte von Ocimum viride vor und nach Zusatz verschiedener gerbstoffällender Verbindungen auf antivirale Wirksamkeit gegen Herpes-, Influenza- und Vaccineviren nach der Papierblättchenmethode geprüft. Darüberhinaus schien es aufschlußreich festzustellen, inwieweit Thymol als Bestandteil des ätherischen Öls von Ocimum viride das Wachstum dieser Virusarten beeinträchtigt.

Herrn Prof. Dr. med. G. May, Zentrum der Hygiene Frankfurt/Main, danke ich für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen.

Bei dem Verfahren des Papierblättchentests wird ein mit dem zu untersuchenden Pflanzenextrakt getränktes Filterpapierstückchen auf zuvor durch den Testvirus infizierte HeLa-Zellen gebracht. Da sich nur die von dem Virus nicht geschädigten Zellen mit Tetrazoliumchlorid anfärben lassen, kann man nach einer Bebrütungsdauer von etwa zwei bis vier Tagen aus der Größe der das Papierblättchen umgebenden Zone Rückschlüsse auf die virustatische Eigenschaft des Pflanzenextraktes ziehen [19].

Nach Zugabe von Gelatinelösung (vgl. S. 8) zum Infus (Extrakt a) trat keinerlei Fällung auf. Weder Konzentrationserhöhung noch Temperaturänderung beeinflußten dieses Ergebnis. Auch aus dem methanolisch-wäßrigen Auszug (Extrakt b) konnte durch Zusatz von Gelatine keine Trennung in eine tanninfreie und tanninhaltige Fraktion erzielt werden.

Versetzen von Extrakt a mit Bleiacetatlösung führte hingegen zu einem deutlichen Niederschlag, bestehend aus wasserunlöslichen Phenolaten [20].

Als dritte Methode wurde das Schütteln mit chromiertem Hautpulver angewandt, da dieses umfassend alle gerbstoffähnlichen Verbindungen adsorbiert [15].

Für die pharmakologische Untersuchung wurden daher neben dem Aufguß selbst (Extrakt a) die nach Fällung mit Bleiacetat und Hautpulver gewonnenen, klaren Filtrate sowie eine gesättigte, wäßrige Thymollösung vorbereitet.

Prüflösungen	Herpes (tox/vir.)	Influenza (tox/vir.)	Vaccine (tox/vir.)
Aufguß DAB 7 (Extrakt a)	0/15	0/0	0/15
Filtrat der Fällung von Extrakt a mit Bleiacetat	0/5	0/0	0/5
Filtrat der Fällung von Extrakt a mit chromiertem Hautpulver	0/3	0/0	0/0
gesättigte Thymollösung	0/0	0/0	0/0

Tab. 1 : Virustatische Wirkung der Pflanzenextrakte gemessen in mm gefärbter Zone im Papierblättchentest nach May

Wie aus der Tabelle zu ersehen, wirkt der unbehandelte Extrakt sowohl auf Herpes- als auch auf Vaccineviren wachstumshemmend; die Filtrate zeigen kaum noch Aktivität; die Thymollösung erweist sich als unwirksam gegenüber den bei diesem Test eingesetzten Virusarten. Wenn auch die Ausbil-

dung einer nur 15 mm breiten Zone von lebenden Zellen eine relativ schwache virustatische Wirkung vermuten läßt, so deutet das Ergebnis dennoch an, daß auch Ocimum viride gerbstoffähnliche Verbindungen mit antiviralen Eigenschaften führt. Auf Influenzaviren ist hingegen bei keiner der Prüflösungen ein hemmender Einfluß festzustellen. Diese Ergebnisse lassen sich in Einklang bringen mit denen von Herrmann und Kucera [20], die die Wirkung von Melissenextrakt an denselben Virusstämmen überprüft haben. Allerdings wählten sie eine andere Prüfmethode, indem sie als Substrat embryonale Zellen von Hühnereiern verwendeten.

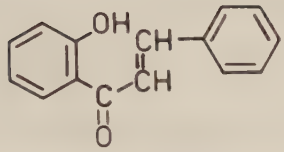
2.2.3. Untersuchung von Flavonoiden

2.2.3.1. Qualitative Nachweisreaktionen

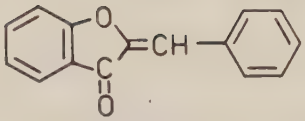
Zu den phenolischen Inhaltsstoffen zählen neben den Hydroxyzimtsäurederivaten auch die Flavonoide, die es nun als nächstes zu untersuchen galt.

Diese Pflanzenstoffgruppe umfaßt biogenetisch eng verwandte Verbindungen mit dem Bauprinzip $C_6 - C_3 - C_6$, wie zum Beispiel Chalkone, Aurone, Catechine, Anthocyanidine und Abkömmlinge des Phenylchromons [21] (vgl. Schema 2).

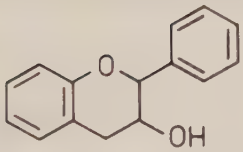
Schema 2



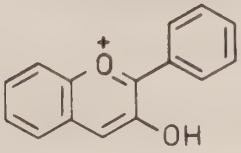
Chalkon



Auron



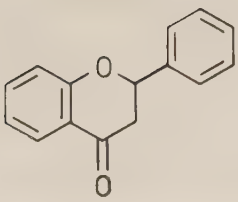
Catechin



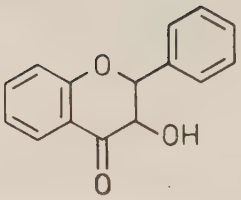
Anthocyanidin

Letztere unterscheiden sich voneinander durch den Oxidationsgrad (Flavanone, Flavanonole, Flavone, Flavonole) und die Verknüpfung der beiden Ringe (2- und 3-Phenylchromon, 4-Phenylchroman) (vgl. Schema 3).

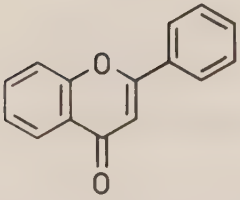
Schema 3



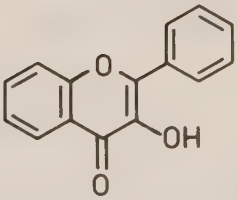
Flavanon



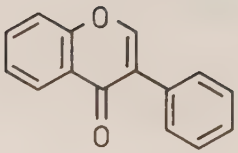
Flavanonol



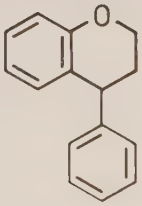
Flavon



Flavonol



3 - Phenylchromon

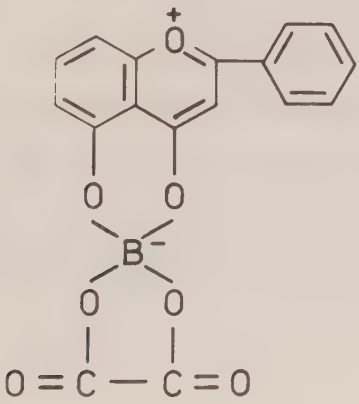


4 - Phenylchroman

Dem qualitativen Nachweis dienen verschiedene Farbreaktionen, wobei durch gezielte Wahl der Proben die Art des Flavonoids genauer bestimmt werden kann.

Die Farbreaktion nach Shinoda [22], die auf der Reduktion von Flavonoiden mit Magnesium in Salzsäure beruht und das Vorliegen von Flavanonen, Flavanonolen und Flavonolen anzeigt, verlief bei der Untersuchung der Prüflösung von Ocimum viride negativ; es war lediglich eine schwache Gelbfärbung zu erkennen.

Beim Eindampfen der Prüflösung mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Bor- und Oxalsäure, einem von Wilson [23] beschriebenen Nachweis, bildete sich ein hellgelber Rückstand, der in etherischer Lösung zitronengelb fluoreszierte. Nach Hörhammer und Hänsel [24] entstehen spiranähnliche Komplexverbindungen. Dabei soll die Anhydridbildung mit Oxalsäure den positiven Charakter des Boratoms in der Weise steigern, daß sich dieses in glatter Reaktion an den nucleophilen Sauerstoff des Flavonoids anlagert.



Die Gelbfärbung deutet auf die Anwesenheit von 5-Hydroxyflavonen und 5-Hydroxyflavonolen hin.

Um einen ersten Überblick über die Zusammensetzung des Flavonoidgemisches zu bekommen, hat sich die zweidimensionale Papierchromatographie als relativ rasch durchzuführende Methode bewährt. Mabry, Markham und Thomas [25] wählen in der ersten Laufrichtung als weniger polares Fließmittelsystem Tertiärbutanol/Eisessig/Wasser (60:20:20) (Laufmittel 1), in der zweiten das stark polare Gemisch aus Eisessig/Wasser (85:15) (Laufmittel 2).

Zur chromatographischen Untersuchung wurde Extrakt c eingesetzt, hergestellt durch mehrere Tage langes Rühren von gepulvertem Pflanzenmaterial in 75%igem Methanol und schonendes Einengen des Filtrats.

Das abgebildete Chromatogramm zeigt die Auftrennung von Extrakt c nach zweidimensionaler Entwicklung in den oben erwähnten Laufmittelsystemen 1 und 2. Der gestrichelt eingezeichnete Bereich mit einem hRF-Wert von etwa 80 im Laufmittel 1 und etwa 15 im Laufmittel 2 erschien im UV-Licht bei 365 nm dunkelrot, blieb unter Einwirkung von Ammoniakdämpfen unverändert und färbte sich nach Ansprühen mit Bor-Oxalsäurelösung tiefgelb, mit Diphenylborsäure-ß-aminoethylester [26] (Naturstoffreagenz A) schwach rot.

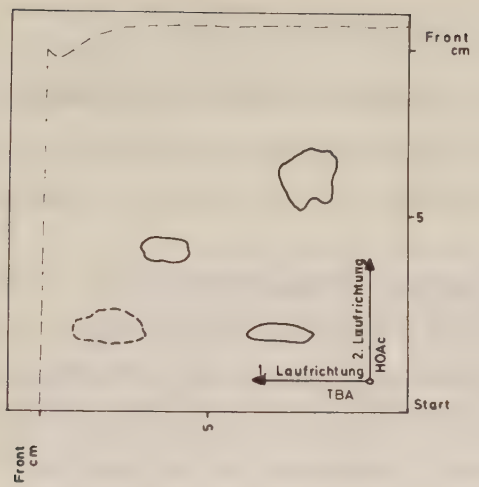


Abb. 3 : Zweidimensionale Papierchromatographie des Flavonoidgemisches

Adsorbens: Whatman Chromatographiepapier Nr. 3

Fließmittel: 1. Laufrichtung Tertiärbutanol/Eisessig/Wasser (60:20:20), 2. Laufrichtung Eisessig/Wasser (85:15)

Detektion: UV-Licht bei 365 nm (Behandlung mit Ammoniak),
Ansprühen mit Bor-Oxalsäurelösung (Gelbfärbung),
Ansprühen mit Diphenylborsäure-ß-aminoethylester (Rotfärbung)

Die Ergebnisse aus den Farbreaktionen zusammen mit der Auswertung des Chromatogramms können als Hinweis für das Vorliegen von 5-Hydroxyflavonen gedeutet werden.

2.2.3.2. Isolierung von Flavon 1

2.2.3.2.1. Präparative Papierchromatographie

Anreicherung und Trennung der Flavonoide erfolgte zunächst mit Hilfe der auf- oder absteigenden, eindimensionalen, präparativen Papierchromatographie.

Der zur Trockne eingedampfte Rückstand des Extrakts c wurde in wenig Methanol-Wasser (3:1) aufgenommen, bandförmig auf Whatman Chromatographiepapier Nr. 3, das von Seikel [27] für die präparative Arbeit aufgrund der hohen Aufnahmekapazität empfohlen wird, aufgetragen und im Laufmittel 2 Eisessig/Wasser (85:15) entwickelt. Um auf den Chromatogrammen die Lage der interessierenden Flavonoide erkennen zu können, die im UV-Licht nur als schlecht auszumachende, dunkle Zonen erscheinen, wurden schmale Längsstreifen von den Chromatogrammen abgetrennt, mit Bor-Oxalsäure oder Naturstoffreagenz A besprüht und zum Vergleich herangezogen. Die den charakteristisch gefärbten Flecken auf den Chromatogrammen entsprechenden Bereiche wurden in kleine Stücke zerschnitten, mit Methanol-Wasser (3:1) eluiert und als Konzentrat wiederholt chromatographiert.

Als günstig erwies sich, daß das quantitativ schlecht zu entfernende Chlorophyll an der Startlinie zurückblieb; nachteilig dagegen war, daß die Gerbstoffe nicht in scharf getrennten Bändern, sondern über das gesamte Chromatogramm verteilt mitliefen.

Fast immer wurde die absteigende Methode der Papierchromatographie angewandt, da sie aufgrund der Möglichkeit, die mit der Fließmittelfront wandernden, für weitere Untersuchungen bedeutungslosen Substanzen abtropfen zu lassen, gegenüber der aufsteigenden Form eine sehr viel längere Trennstrecke bietet.

Das Wechselspiel von Anreichern und Auftrennen führte schließlich zu einer im UV-Licht einheitlich erscheinenden dunkelgefärbten Zone. Das Eluat schlug sich beim Eindampfen an der Kolbenwand als gelblicher Ölfilm (Substanz 1) nieder.

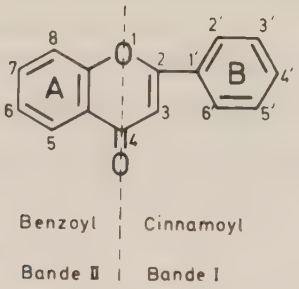
2.2.3.3. Strukturaufklärung von Flavon 1

2.2.3.3.1. UV-spektroskopische Untersuchung

Eine zur Strukturaufklärung von Flavonoidverbindungen recht aussagekräftige Meßmethode stellt die UV-Spektroskopie dar [25,28]; sie bietet zudem den großen Vorteil, daß schon mit geringen Spuren an Substanz gute Meßwerte erzielt werden [29].

In Methanol oder Ethanol aufgenommene UV-Spektren von Flavonen und Flavonolen (3-Hydroxyflavonen) zeigen in den Bereichen von 300 - 380 nm und 240 - 280 nm zwei Absorptionen relativ hoher Intensität, wobei die Bande bei kürzeren Wellenlängen (Bande II) das Benzoylsystem (Ring A) charakterisiert, während die Bande im längerwelligen Bereich (Bande I) Rückschlüsse auf die Substitution am

Cinnamoylrest (Ring B) zuläßt [28]. So nimmt zum Beispiel eine Hydroxylierung im Ring B auf die Lage der Bande II keinen Einfluß, Bande I hingegen erfährt je nach Anzahl der eingeführten Hydroxylgruppen eine ausgeprägte bathochrome Verschiebung.



Zusatz von ionisierenden oder komplexbildenden Reagenzien ruft Veränderungen der Absorptionsmaxima hervor, die wertvolle Hinweise auf das Substitutionsmuster von Flavonoiden geben [25].

Einige wesentliche Strukturaussagen sollen im folgenden zusammengefaßt werden:

Als Unterscheidungshilfe zwischen Flavonen und Flavonolen (3-Hydroxyflavonen mit freier Hydroxylgruppe) dient Natriummethylat. Aufgrund seiner hohen Basizität ionisiert es jegliche Hydroxylgruppe unabhängig von deren Stellung im Molekül. Tritt dabei im Spektrum eine bathochrome Verschiebung der Bande I um etwa 40 - 65 nm ohne Verringerung der Intensität auf, so deutet dies auf eine Hydroxylgruppe in 4'-Stellung hin, erscheint dagegen Bande I bei einem um etwa

50 - 60 nm längerwelligen Maximum unter deutlicher Intensitätsabnahme, so kann auf das Vorliegen einer Hydroxylgruppe am C-3 (Flavonol) geschlossen werden. Flavonole mit zusätzlicher Hydroxylgruppe in 4'-Stellung zersetzen sich in methanolischer Natriummethylatlösung innerhalb von wenigen Minuten.

Als weit schwächere Base vermag Natriumacetat hingegen nur die relativ aciden Protonen der Hydroxylgruppen in 3-, 7- und 4'-Stellung abzuspalten. Die Anwesenheit einer freien Hydroxylgruppe in 7-Stellung führt zu einer bathochromen Verschiebung der Bande II um 5 - 20 nm; eine deutlich erkennbare Schulter von Bande I in Richtung längerer Wellenlängen zeigt eine Hydroxylgruppe am C-4' an bei gleichzeitiger Abwesenheit von freien Hydroxylgruppen in 3- und 7-Position.

In Gegenwart von Natriumacetat bildet Borsäure mit ortho-Dihydroxystrukturen sowohl am Ring A als auch am Ring B Chelatkomplexe aus, erkennbar an der bathochromen Verschiebung der Bande II (5 - 10 nm) bzw. Bande I (12 - 30 nm).

Ebenso wie Borsäure geht Aluminiumchlorid mit ortho-Dihydroxystrukturen Komplexverbindungen ein. Dabei läßt sich durch Vergleich der Spektren vor und nach Zugabe von Salzsäure unterscheiden zwischen säurestabilen Komplexen, gebildet mit der Carbonylgruppe am C-4 und der benachbarten Hydroxylgruppe in 3- oder 5-Stellung, und säurelabilen Komplexen, hervorgegangen aus der Reaktion mit vicinalen Hydroxylgruppen am Ring A bzw. B. Ob der säurestabile Komplex unter Beteiligung der Hydroxylgruppe am C-3 oder C-5

zustande gekommen ist, läßt sich häufig aus der Größe der bathochromen Verschiebung von Bande I entnehmen, bei 5-Hydroxyflavonen beträgt sie 35 - 55 nm, bei 3-Hydroxyflavonen 60 nm.

Die aus den UV-Spektren (vgl. Abb. 4A, 4B, 4C) der oben beschriebenen, papierchromatographisch angereicherten Substanz 1 (vgl. S. 21) ermittelten Meßdaten sind in nachfolgender Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab. 2 : UV-Absorptionsmaxima der isolierten Substanz 1 (λ_{max}, nm); sh = Schulter

MeOH	283	294sh	332	
MeOH + NaOMe	275	300sh	364sh	392
MeOH + $AlCl_3$	264sh	287	311	360
MeOH + $AlCl_3$/HCl	265sh	287	311	352
MeOH + NaOAc	276	298sh	339sh	392
MeOH + NaOAc/H_3BO_3	280	296sh	335	

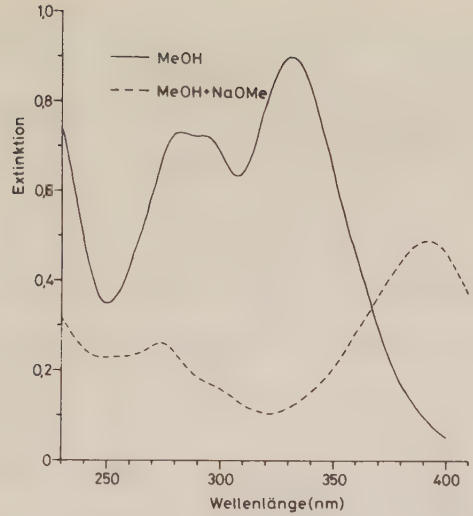


Abb. 4A : UV-Spektren von Substanz 1 in MeOH und MeOH + NaOMe

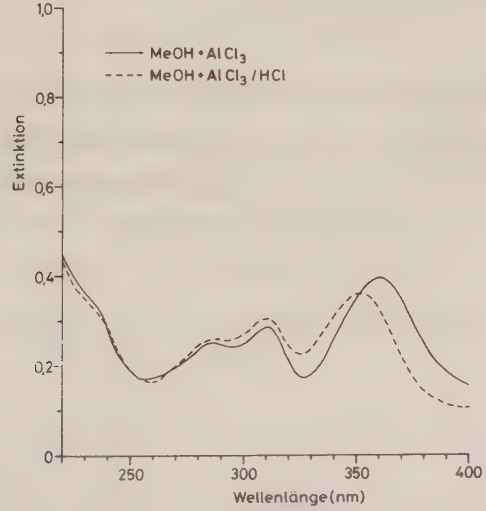


Abb. 4B : UV-Spektren von Substanz 1 in MeOH + $AlCl_3$ und MeOH + $AlCl_3$/HCl

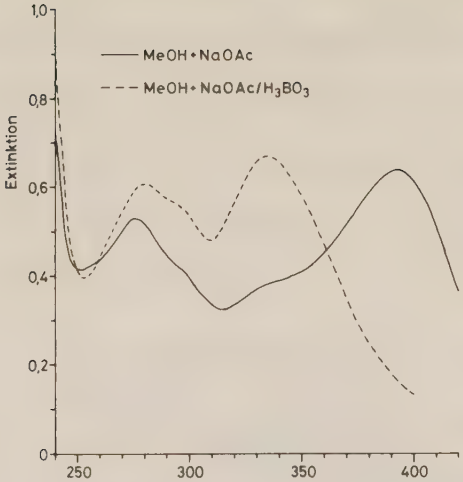


Abb. 4C : UV-Spektren von Substanz 1 in MeOH + NaOAc und MeOH + $NaOAc/H_3BO_3$

Das in reinem Methanol aufgenommene Spektrum zeigt die beiden für Flavonoidverbindungen charakteristischen Maxima. Bande I erscheint bei einer für Flavone typischen Wellenlänge von 332 nm. Allerdings können auch Flavonole, deren Hydroxylgruppe am C-3 substituiert ist, in diesem Bereich absorbieren, nicht aber Flavonole mit freier Hydroxylgruppe [25].

Die durch Zusatz von Natriummethylat hervorgerufene, bathochrome Verschiebung um 60 nm bei ansteigender Intensität weist auf eine freie Hydroxylgruppe in 4'-Stellung des Seitenphenyls hin.

Mit Aluminiumchlorid geht die zu untersuchende Substanz eine säurestabile Komplexverbindung ein, die unter Beteiligung der Carbonylgruppe am C-4 und einer unsubstituierten 5-Hydroxylgruppe entstanden sein muß. Die für 5-Hydroxyflavone meist auftretende Aufspaltung der beiden Banden in jeweils zwei Spitzen erscheint im Aluminiumchlorid/Salzsäure-Spektrum dieses Flavonoids nur schwach angedeutet.

Das mit Natriumacetat gemessene Spektrum bestätigt die Anwesenheit einer freien Hydroxylgruppe in 4'-Position des Cinnamoylrestes. Bande II erfährt keine Verschiebung in den längerwelligen Bereich. Vermutlich fehlt eine freie Hydroxylgruppe in 7-Stellung; durch Substitution an C-6 und C-8 kann jedoch auch bei Anwesenheit einer Hydroxylgruppe am C-7 die Acidität des Hydroxylprotons so weit herabgesetzt worden sein, daß Natriumacetat als schwache Base nicht mehr zu ionisieren vermag und somit eine bathochrome Verschiebung unterbleibt.

Borsäurezusatz nimmt keinen Einfluß auf die Absorptionsmaxima, so daß eine ortho-Dihydroxystruktur sowohl am Ring A als auch am Ring B ausgeschlossen werden kann.

2.2.3.2.2. Säulenchromatographie

Aus der Interpretation der UV-Spektren lassen sich zwar einzelne, wesentliche Strukturmerkmale eines unbekannten Flavonoids ableiten, für die umfassende Aufklärung der Substanz müssen jedoch weitere Meßverfahren wie Infrarot-, Massen- und Kernresonanz-Spektroskopie herangezogen werden.

Zur Ausführung dieser Methoden bedarf es allerdings größerer Substanzmengen, möglichst in kristalliner Form.

Über das Verfahren der Papierchromatographie konnte diese Forderung nicht erfüllt werden. Beim Eluieren der Unzahl von Papierstückchen hat es sich nicht vermeiden lassen, daß auch Spuren von Begleitstoffen aus Papier, Lösungsmittel und Pflanze herausgelöst wurden. Daher blieb bei der geringen Ausbeute an isolierter Substanz eine Kristallisation aus. Darüberhinaus schien diese Methode, deren Stärke vornehmlich in der Trennleistung begründet liegt, zu langwierig, um größere Substanzmengen zu gewinnen.

Zur Anreicherung im präparativen Maßstab wird die Säulenchromatographie als geeignetes Verfahren beschrieben [25,27].

Neben den gebräuchlichen Adsorbentien wie Silicagel oder Cellulosepulver hat sich zur Trennung von Phenolgemischen Polyamid als Füllmaterial besonders bewährt [25]. Dieses hochmolekulare Kunststoffmaterial (Produkte aus Perlon oder Nylon) bietet unter anderem den Vorteil, ohne Gefahr von Überladung relativ viel Substanz auf einmal aufnehmen zu können.

Die Elution erfolgt mit einfachen Lösungsmitteln, beginnend mit Wasser, das anorganische Salze, lösliche organische Säuren, Zucker und Gerbstoffe herunterwäscht. Nachfolgend werden Wasser-Methanol-Gemische verwendet mit allmählich ansteigender Alkoholkonzentration. Durch diese kontinuierliche Erhöhung des lipophilen Anteils im Elutionsmittel gelingt es, Polyhydroxyverbindungen, deren Polarität durch die Anzahl der freien Hydroxylgruppen im Molekül bestimmt wird, in verschiedenen Fraktionen zu erfassen.

Der wäßrig-methanolische Pflanzenauszug (Extrakt c) wurde auf wenig Polyamidpulver aufgezogen und als oberste Schicht auf die mit Polyamidpulver trocken gefüllte Säule gebracht. Die Elution startete wie schon beschrieben mit reinem Wasser. Sobald die zunächst dunkelbraungefärbte Extraktionsflüssigkeit nahezu farblos abtropfte, wurde Methanol in einer Konzentration von zehn Prozent zugesetzt; nach und nach stieg der Alkoholanteil auf zwanzig, dreißig usw. Prozent.

Aus der Fraktion mit einem Gehalt von etwa vierzig Prozent Methanol, im folgenden als Eluat d bezeichnet, schieden sich bei allmählichem Verdunsten des Lösungsmittels an der Luft feingliedrige, gelbe Kristallnadeln ab. Von dieser Substanz aufgenommene UV-Spektren zeigten in den Absorptionsmaxima vollkommene Übereinstimmung mit den oben angegebenen (vgl. S. 24). Ein zweidimensional entwickeltes Papierchromatogramm in den Laufmitteln 1 und 2 (vgl. S. 19) bestätigte die schon zuvor ermittelten hRF-Werte von 85 (Laufmittel 1) bzw. 22 (Laufmittel 2). Es war also gelungen, die aus dem Pflanzenextrakt papierchromatographisch angereicherte, ölige Substanz 1 auf dem Weg der Säulenchromatographie über Polyamid kristallin zu erhalten. Ihr Schmelzpunkt beträgt 225 °C.

2.2.3.3.2. IR-spektroskopische Untersuchung

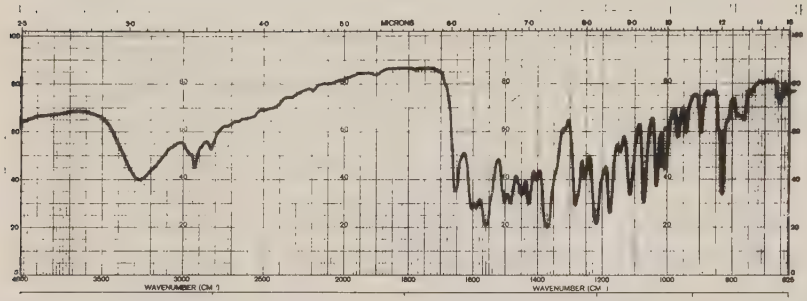


Abb. 5 : IR-Spektrum von Substanz 1 (KBr)

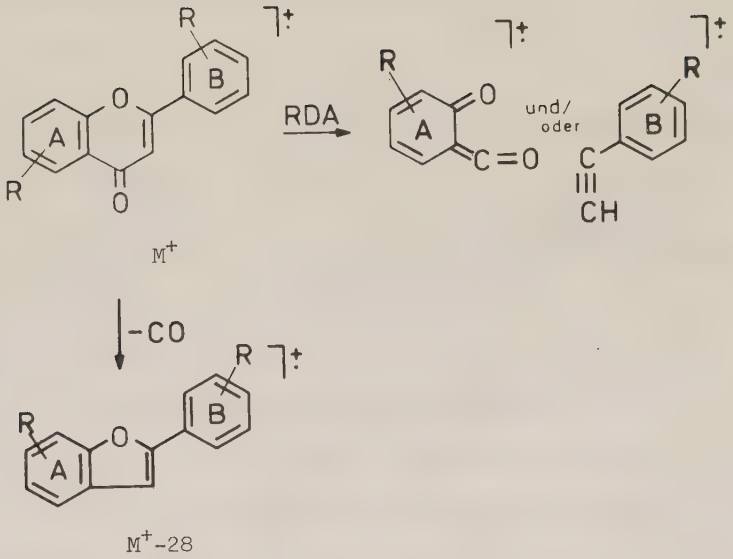
Betrachtet man das IR-Spektrum der in Form eines KBr-Preßlings vermessenen Substanz, so widerspricht keine der Absorptionsbanden einer vermuteten Flavonstruktur. Die breite Bande bei 3270 cm^{-1} läßt sich einer O-H-Valenzschwingung zuordnen, während die bei 2960 cm^{-1} und 2930 cm^{-1} auftauchenden Absorptionen als Valenzschwingungen gesättigter C-H-Bindungen interpretiert werden können. Die Bande bei 2830 cm^{-1} deutet das Vorliegen von Methoxylgruppen am Aromaten an. Wie für 5-Hydroxyflavone beschrieben [30], erscheint auch in diesem Spektrum bei 1655 cm^{-1} eine deutliche durch die Carbonylvalenzschwingung hervorgerufene Absorption. Die beiden Schwingungsfrequenzen bei 1500 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} sind charakteristisch für aromatische Ringsysteme; darüberhinaus sprechen die Banden bei 1590 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} für weitere Konjugation des Arylringes. Die durch Wasserstoffbrückenbindung stark verbreiterte

Bande oberhalb von 3000 cm^{-1} überdeckt möglicherweise vorliegende Valenzschwingungen ungesättigter C-H-Bindungen. Die scharf hervortretende Absorption bei 830 cm^{-1} weist auf C-H-Deformationsschwingungen zweier benachbarter Phenylwasserstoffatome hin; die durch Auswertung der UV-Meßdaten naheliegend erscheinende Substitution des Seitenphenylrings in 4'-Stellung findet also im IR-Spektrum ihre Bestätigung.

2.2.3.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung

Die massenspektrometrische Untersuchung ist für die Strukturaufklärung von Flavonoiden von besonderem Wert [31]. Aus dem Fragmentierungsverhalten der nur in geringen Mengen erforderlichen Substanz und durch Vergleich der Intensitäten der einzelnen Bruchstücke miteinander läßt sich die Zugehörigkeit zu einer der zahlreichen Flavonoidgruppen näher bestimmen.

Nach Barnes und Occolowitz [32] erscheint das Molekülion von einfach gebauten Flavonen als der stärkste Peak im Spektrum (base peak). Die Spaltung des Heterocyclus erfolgt durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA), bei der die Ringe A und B als Schlüsselbruchstücke erhalten bleiben. Eine weitere Fragmentierungsmöglichkeit bietet die Abspaltung von C=O aus dem Molekül (M-28) unter Bildung eines Phenylbenzofuranions.



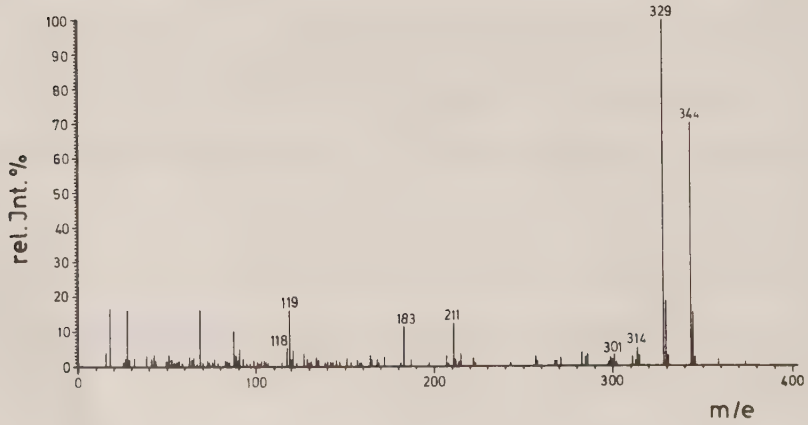
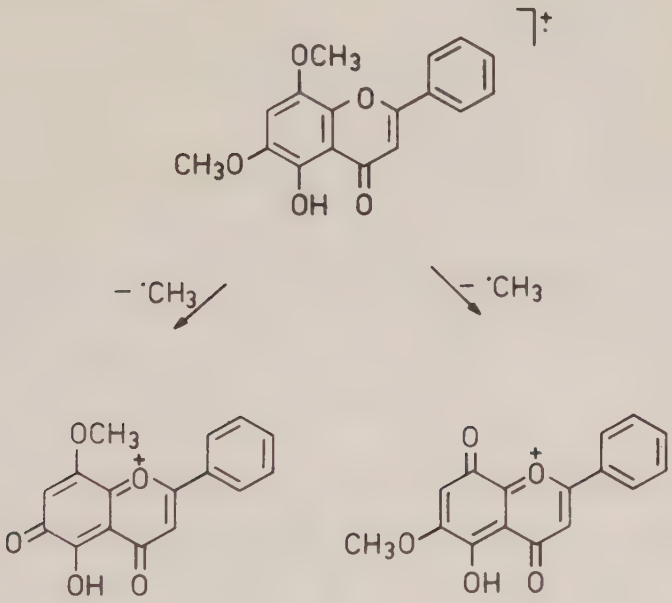


Abb. 6 : Massenspektrum von Substanz 1 (142 °C)

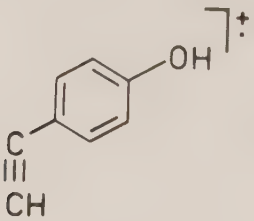
Bei Betrachtung des abgebildeten Massenspektrums fällt auf, daß nicht das Molekülion $M^{+\cdot}$ 344 selbst, sondern der Peak bei m/e 329 die höchste relative Intensität besitzt. Offensichtlich entsteht durch Abspaltung einer Methylgruppe vom Molekülion (M-15) ein äußerst stabiles Bruchstück m/e 329. Nach Kingston [33] bilden Flavone, die am C-6 und/oder am C-8 eine Methoxylgruppe tragen, unter Verlust einer Methylgruppe (M-15) ein resonanzstabilisiertes Chinonkation folgender Struktur:



Durch anschließende Abspaltung von C=O aus dem Chinon m/e 329 (M-15) entsteht ein neues Bruchstück bei m/e 301 (M-43).

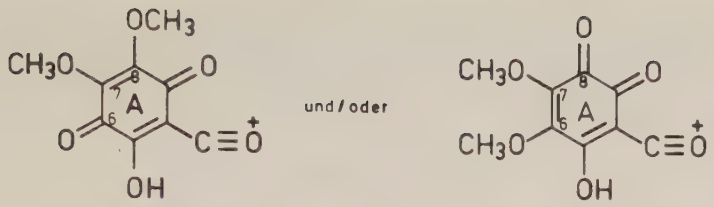
Bei der Fragmentierung von 3-Methoxyflavonen tritt hingegen bevorzugt die Abspaltung eines Acetylrests unmittelbar aus dem Molekülion (M-43) auf. Die Spitze (M-15) fehlt entweder gänzlich oder ist nur schwach angedeutet [34].

Ausgehend von dem Chinon m/e 329 führt der Retro-Diels-Alder-Zerfall zu den beiden Hauptbruchstücken m/e 211 und m/e 119. Das letztere beschreibt das Phenylacetylenion m/e 118, das durch Einfang eines Wasserstoffatoms einen weiteren Peak bei m/e 119 zeigt. Unter Einbeziehung der UV- und IR-spektroskopischen Daten müßte für dieses Fragment die Beschreibung folgender Struktur zutreffend sein:



m/e 118

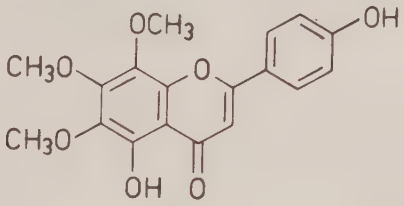
Das Schlüsselbruchstück m/e 211, das die Substitution am Ring A des Flavongerüsts widerspiegelt, sollte ebenso wie das Fragment m/e 329 als Chinon formuliert werden. Seine hohe Massenzahl deutet neben der als gesichert anzusehenden Hydroxylgruppe in 5-Stellung eine Substitution des Benzoylrings durch zwei weitere Methoxylgruppen an, so daß folgende Struktur abgeleitet werden kann:



m/e 211

2.2.3.4. Strukturvorschlag von Flavon 1

Faßt man die bislang aus den verschiedenen Verfahren gewonnenen Ergebnisse zusammen und stellt sie in Beziehung zueinander, so bietet sich für den isolierten Inhaltsstoff mit dem massenspektrometrisch ermittelten Molekulargewicht 344 und der durch die Elementaranalyse erhärteten Summenformel $C_{18}H_{16}O_7$ folgende Struktur an:



5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon

2.2.3.3.4. ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung

Eine Bestätigung für die Formulierung des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons gibt darüberhinaus das ^{1}H-Kernresonanzspektrum.

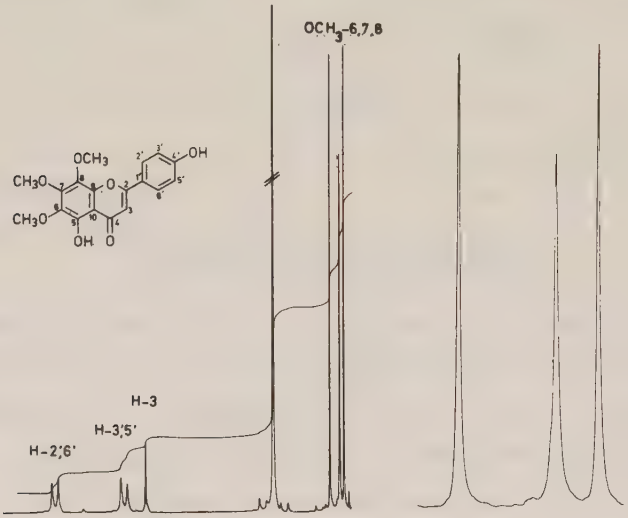


Abb. 7 : ^{1}H-NMR-Spektrum von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 in CD_3OD
(Dehnung 100 Hz im Bereich der Methoxylgruppen)

Die Löslichkeit des Flavons in Tetradeuteromethanol wird durch die Methoxylgruppen so weit gesteigert, daß sich eine vorherige Überführung der Substanz in die Trimethylsilylether erübrigt.

Die Signale der drei Methoxylgruppen an den C-Atomen 6, 7 und 8, deren genaue Zuordnung unsicher bleibt, tauchen in dem erwarteten Bereich bei δ = 3,88 , δ = 3,94 und δ = 4,07 ppm auf. Das einzelne Proton am C-3 kommt als

scharfes Singulett bei δ = 6,61 ppm zur Resonanz. Die bei tieferem Feld auftretenden vier symmetrisch angeordneten Signale mit schwach angedeuteten Nebenbanden bilden das für den para-disubstituierten Benzolring charakteristische, vereinfachte AA'BB'-System [35] mit den Resonanzlinien bei δ = 6,85 und δ = 6,95 ppm (H-5' und H-3') und bei δ = 7,80 und δ = 7,94 ppm (H-6' und H-2'). Die Hydroxylgruppe in 4'-Stellung ruft in ortho-Position eine erhöhte Elektronendichte hervor, so daß die Phenylprotonen an C-3' und C-5' eine stärkere Abschirmung erfahren und somit bei höherem Feld zur Resonanz kommen als die an C-2' und C-6'. Diese Art der Zuordnung wird gestützt durch den Vergleich mit in der Literatur [25] veröffentlichten Spektren entsprechend substituierter Flavone.

2.2.3.3.5. ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchung

Zur Vervollständigung der spektroskopischen Untersuchungen wurde ein ^{13}C-NMR-Spektrum von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 angefertigt.

Herrn Dr. R. Matusch danke ich für Anregungen zur Interpretation einiger ^{13}C-NMR-Spektren.

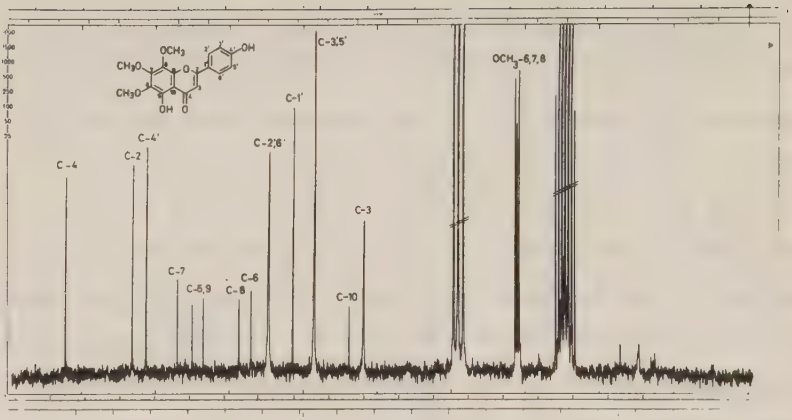


Abb. 8 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 in $CDCl_3/CD_3OD$ (3:1), ^{1}H-entkoppelt

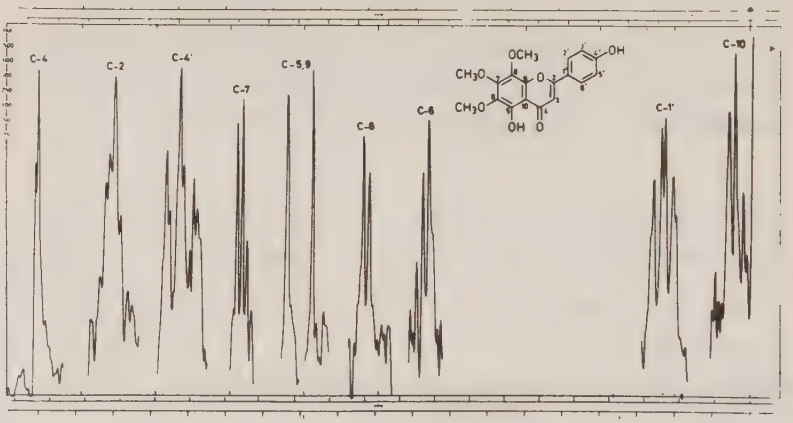


Abb. 9 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 in $CDCl_3/CD_3OD$ (3:1), ^{1}H-gekoppelt, gedehnt (Ausschnitte)

Die C-Atome der drei Methoxylgruppen, die im gekoppelten Spektrum jeweils ein Quartett bilden, erscheinen bei δ= 61,36 , δ= 61,90 und δ= 62,39 ppm.

Die drei im gekoppelten Spektrum als Dubletts auftretenden Signale bei δ= 103,18 , δ= 116,46 und δ= 128,69 ppm werden durch tertiäre C-Atome hervorgerufen.

Aufgrund der im gedehnten gekoppelten Spektrum erkennbaren Feinaufspaltung und durch Vergleich mit Literaturwerten von Flavonen mit einer Hydroxylgruppe in 4'-Stellung des Seitenphenylrings [36,37] sind die Absorptionen bei δ= 116,46 und δ= 128,69 ppm auf die H-substituierten C-Atome des Phenylrings zurückzuführen. Nach Stothers [38] verursacht die Substitution eines Benzolrings durch eine Hydroxylgruppe eine Hochfeldverschiebung der orthoständigen C-Atome, hingegen eine Tieffeldverschiebung der metaständigen, so daß C-3' und C-5' bei niedrigerem ppm-Wert (116,46), C-2' und C-6' bei höherem ppm-Wert (128,69) zur Resonanz kommen.

Als einziges noch verbleibendes, tertiäres C-Atom erscheint das C-3 des Flavongerüsts infolge seiner Stellung innerhalb des vinylogen Lactons erwartungsgemäß bei einem relativ niedrigen ppm-Wert von δ= 103,18.

Die genaue Zuordnung der übrigen zehn Signale, die im gekoppelten Spektrum keine weitere Aufspaltung durch ^{1}J-Kopplungen erfahren und somit quartäre C-Atome beschreiben, gestaltet sich schwierig.

Da der sp^2-hybridisierte Kohlenstoff der Carbonylgruppe am stärksten tieffeldverschoben sein sollte, kann das Signal bei δ= 183,50 ppm mit ziemlicher Sicherheit diesem zugeordnet werden. Im gedehnten gekoppelten Spektrum wird die durch Kopplung mit dem benachbarten H-3 hervorgerufene Aufspaltung des Signals zu einem engen Dublett sichtbar.

Im Gegensatz zum C-3 müßte das C-2 aufgrund der vinylogen Lactongruppierung deutlich tieffeldverschoben sein. In der Feinaufspaltung sollte sein Resonanzsignal durch Kopplung mit den Phenylprotonen H-2' und H-6' als Triplett erscheinen, dessen drei Äste durch weitere Kopplung mit dem H-3 über zwei Bindungen in je ein Dublett zerfallen. Das Signal bei δ= 165,45 ppm erfüllt diese Voraussetzungen. Darüberhinaus bestätigt das Fehlen eines Signals in diesem ppm-Bereich in dem ^{13}C-NMR-Spektrum des Flavanons 9a (vgl. S. 64) die Richtigkeit der Zuordnung für das C-2.

Für das C-4' läßt sich ein durch Kopplung über drei Bindungen mit H-2' und H-6' entstehendes Triplett voraussagen, dessen drei Linien durch die orthoständigen Phenylprotonen H-3' und H-5' weitere Aufspaltung zu je einem Triplett erfahren. Ein derartiges Multiplett taucht im gedehnten gekoppelten Spektrum bei δ= 161,67 ppm auf.

Für die drei Methoxylgruppen tragenden C-Atome sind Quartetts zu erwarten ohne weitere sichtbare Feinaufspaltung. Die Signale bei δ= 153,25 , δ= 136,62 und δ= 133,43 ppm entsprechen dieser Forderung.

Die beiden im gedehnten gekoppelten Spektrum als Singuletts erscheinenden Signale bei δ = 149,27 und δ = 146,27 ppm werden vermutlich durch C-9 und das eine Hydroxylgruppe führende C-5 hervorgerufen, wobei die genaue Zuordnung unsicher bleibt.

Ähnlich wie das Signal des C-4' erscheint auch das des C-1' bei δ = 122,20 ppm im gedehnten gekoppelten Spektrum durch ^{3}J-Kopplung mit den Phenylprotonen H-3' und H-5' als Triplett, dessen drei Äste allerdings nicht wie beim C-4' in weitere Tripletts, sondern durch zufällig gleichgroße Kopplungskonstanten der beiden orthoständigen Ringprotonen H-2' und H-6' und des H-3 in drei weitere Quartetts aufspalten.

Das von allen quartären C-Atomen am weitesten hochfeldverschobene ist das C-10, dessen Resonanzsignal bei δ = 107,10 ppm mit in der Literatur für Flavone aufzufindenden Angaben übereinstimmt [39,40]. Es unterliegt einer Aufspaltung zu einem Dublett, verursacht durch Kopplung über drei Bindungen mit H-3.

2.2.3.5. Isolierung von Flavon 10

2.2.3.5.1. Umkehrphasenchromatographie

Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der über die Polyamidsäule mit vierzigprozentigem Methanol gewonnenen Fraktion (Eluat d, vgl. S. 29) konnte eine weitere, im UV-Licht dunkelviolett erscheinende Zone ausgemacht werden.

Der hRF-Wert dieser Substanz unterscheidet sich nur geringfügig von dem des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1. Die deutlichste Auftrennung der dicht beieinanderliegenden Flecken gelang in dem Fließmittelsystem Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10).

Die ähnliche Polarität der beiden Substanzen erschwerte die chromatographische Aufarbeitung der Zone mit etwas niedrigerem hRF-Wert zu einem analysenreinen Produkt außerordentlich, zumal das aus der methanolischen Lösung auskristallisierende 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 offensichtlich in weit höherer Konzentration in dem Eluat vorliegt.

Nach zahlreichen Fehlversuchen mit immer wieder abgewandelten Verfahren der Papier-, Dünnschicht- und Säulenchromatographie führte schließlich die verteilungschromatographische Trennung mit lipophiler stationärer und hydrophiler mobiler Phase über die Säule zum erwünschten Erfolg.

Als stationäre Phase dieser Umkehrphasenchromatographie - auch reversed phase chromatography genannt - diente hydrophobiertes Kieselgel mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 Å, dessen hydrophile Silanolgruppen durch unpolare Dimethylsilylgruppen ersetzt sind.

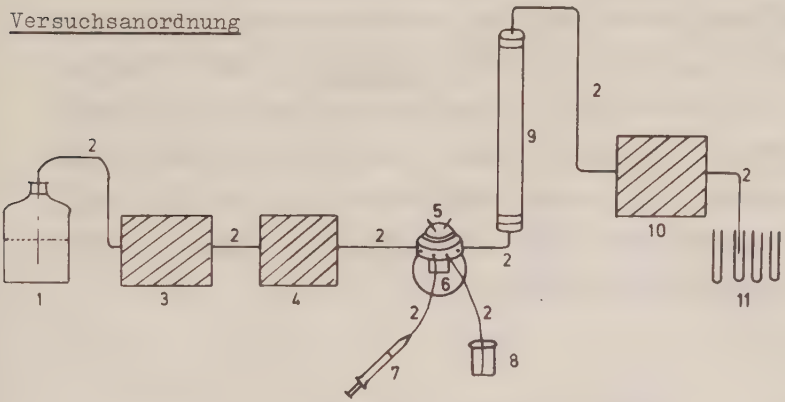
Zur Steigerung der Durchflußgeschwindigkeit wurde über eine Dosierpumpe mit Pulsationsdämpfer der Druck auf etwa 6 bar angehoben.

Die trocken gefüllte Säule wurde vor Beginn der eigentlichen Trennung mit fünfzigprozentigem Methanol, dem späteren Elutionsmittel, längere Zeit in aufsteigender Richtung durchspült. Eingeschlossene Luft konnte auf diese Weise ent-

weichen. Um etwaige Verunreinigungen aus dem Lösungsmittel abzufangen, wurde eine kurze, mit Kieselgel gefüllte Säule vorgeschaltet.

Die Aufgabe des in wenig fünfzigprozentigem Methanol aufgenommenen Eindampfrückstandes von Eluat d (vgl. S.29) erfolgte über eine Warteschleife, aus der das zu trennende Substanzgemisch nach Drehen des Dosierhahns durch das einströmende Elutionsmittel in die Säule gedrückt wurde. Das vom oberen Säulenende abfließende Eluat wurde direkt in die Durchflußküvette eines UV-Absorptionsdetektors geleitet und in Fraktionen getrennt aufgefangen.

Versuchsanordnung



1	Vorratsgefäß	5	Dosierhahn	9	Säule
2	PTFE-Schlauch	6	Warteschleife	10	Detektor
3	Dosierpumpe	7	Spritze	11	Sammelgefäße
4	Pulsationsdämpfer	8	Auffanggefäß		

Die weitere Untersuchung der im Wasserstrahlpumpenvakuum eingeengten Fraktionen erfolgte durch dünnschichtchromatographische Trennung auf Kieselgel 60 F_{254} im bewährten Laufmittelgemisch Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10).

Durch Auswertung der zahlreichen Chromatogramme ergab sich, daß die beiden oben erwähnten, im UV-Licht bei 365 nm dunkelviolett erscheinenden Substanzen auf dem hydrophobierten Kieselgel einen genügend großen Unterschied in ihren Retentionszeiten aufweisen, um getrennt voneinander eluiert werden zu können. Da das 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 in der späteren Fraktion auftauchte, darf man wohl annehmen, daß es sich um die lipophilere der beiden Substanzen handelt.

Zur Anreicherung der noch zu analysierenden Verbindung 10 wurde der von Polyamid heruntergewaschene Extrakt (Eluat d, vgl. S.29) in mehreren kleinen Anteilen nach der reversed phase-Methode chromatographiert. Aus den vereinigten Eluaten kristallisierte die gewünschte Substanz 10 beim Verdunsten des Lösungsmittels an der Luft in Form von hellgelben Nadeln. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 256 °C.

2.2.3.6. Strukturaufklärung von Flavon 10

2.2.3.6.1. UV-spektroskopische Untersuchung

Die Maxima der in Methanol aufgenommenen UV-Spektren sind in Tabelle 3 zusammengestellt:

Tab. 3 : UV-Absorptionsmaxima der isolierten Substanz 10 (λ_{max}, nm); sh = Schulter

MeOH	275	334		
MeOH + NaOMe	272	296sh	387	
MeOH + $AlCl_3$	263sh	288sh	300	362
MeOH + $AlCl_3$/HCl	261sh	286sh	298	353
MeOH + NaOAc	273	345sh	390	
MeOH + NaOAc/H_3BO_3	274	338		

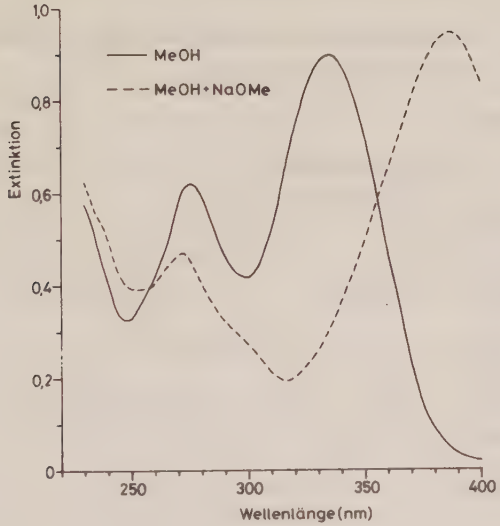


Abb. 10A : UV-Spektren von Substanz 10 in MeOH und MeOH + NaOMe

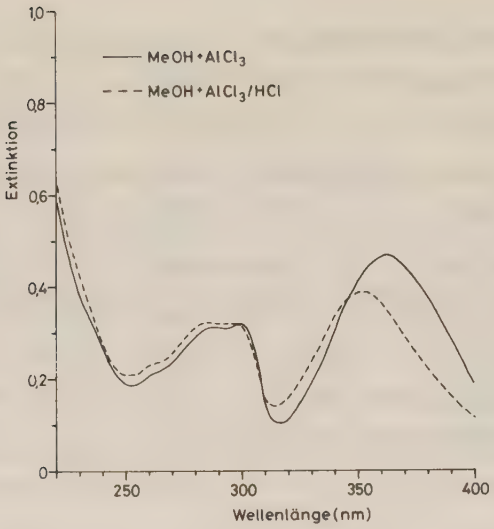


Abb. 10B : UV-Spektren von Substanz 10 in MeOH + $AlCl_3$ und MeOH + $AlCl_3$/HCl

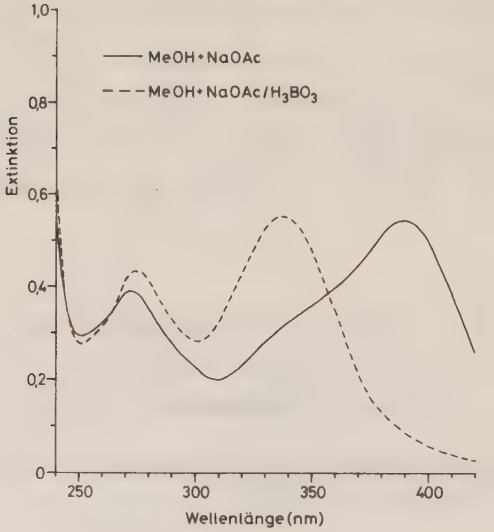


Abb. 10C : UV-Spektren von Substanz 10 in MeOH + NaOAc und MeOH + NaOAc/H_3BO_3

Die Interpretation der Meßdaten dieses Naturstoffs macht das Vorliegen eines weiteren Flavons wahrscheinlich.

In dem in reinem Methanol aufgenommenen Spektrum erscheinen die für diese Verbindungsklasse zu erwartenden beiden Maxima bei 334 nm (Bande I) und 275 nm (Bande II).

Die durch Natriummethylat hervorgerufene bathochrome Verschiebung der Bande I um 53 nm zeigt die Substitution des Seitenphenylrings durch eine Hydroxylgruppe in 4'-Stellung an.

Ebenso wie mit dem vorher beschriebenen geht Aluminiumchlorid auch mit diesem Flavon eine in Salzsäure beständige Komplexverbindung ein. Aus der relativ geringen Verschiebung der Bande I von nur 28 nm in den längerwelligen Bereich wird deutlich, daß die Carbonylgruppe am C-4 und die freie Hydroxylgruppe am C-5 an der Komplexbildung beteiligt sind.

Zusatz von Natriumacetat nimmt lediglich auf die Absorption von Bande I Einfluß. Die bathochrome Verschiebung um 56 nm stützt die schon oben gemachte Behauptung, daß der Seitenphenylring (Ring B) in 4'-Stellung eine freie Hydroxylgruppe besitzt. Da Bande II bei unveränderter Wellenlänge absorbiert, kann die Anwesenheit einer freien Hydroxylgruppe in 7-Stellung ausgeschlossen werden.

Borsäure bewirkt keine Verschiebung der Banden; die UV-Daten lassen also sowohl am Ring A als auch am Ring B ortho-Dihydroxystrukturen nicht zu.

2.2.3.6.2. IR-spektroskopische Untersuchung

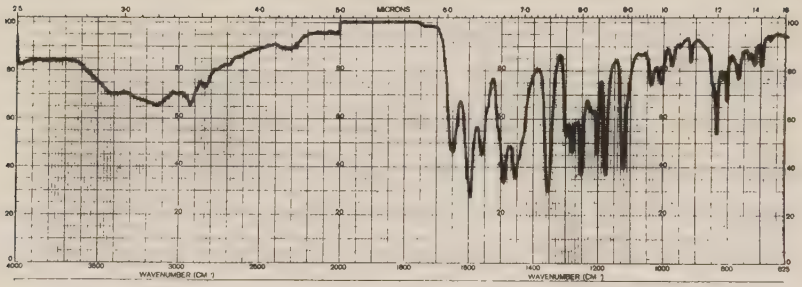


Abb. 11 : IR-Spektrum von Substanz 10 (KBr)

Das IR-Spektrum festigt die Annahme, daß auch diese Substanz eine Flavonstruktur besitzt (vgl. S. 30).

Die O-H-Valenzschwingung erscheint wiederum als verbreiterte Bande mit einem Maximum bei 3120 cm^{-1}. Die vier Absorptionen bei 3005 cm^{-1}, 2960 cm^{-1}, 2935 cm^{-1} und 2840 cm^{-1} lassen sich auf Streckschwingungen von C-H-Einfachbindungen zurückführen, wobei die Absorption bei 3005 cm^{-1} als Hinweis auf olefinische und/oder aromatische Protonen, die bei 2840 cm^{-1} auf das Vorliegen von Methoxylgruppen am Aromaten angesehen werden darf. Neben der Carbonylvalenzschwingung bei der für 5-Hydroxyflavone [30] charakteristischen Wellenzahl von 1655 cm^{-1} tauchen aromatische Verbindungen kennzeichnende Banden bei 1595 cm^{-1}, 1560 cm^{-1}, 1490 cm^{-1} und 1455 cm^{-1} auf. Die C-H-Deformationsschwingung bei 830 cm^{-1} deutet eine para-Disubstitution des Flavons im Seitenphenylring an.

Aus Interpretation und direktem Vergleich mit dem IR-Spektrum des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 (vgl. S.30) läßt sich auch für diese Substanz die Struktur eines 5,4'-Dihydroxyflavons ableiten; Art und Anordnung der Substituenten am Ring A bleiben jedoch noch unbestimmt.

2.2.3.6.3. Massenspektrometrische Untersuchung

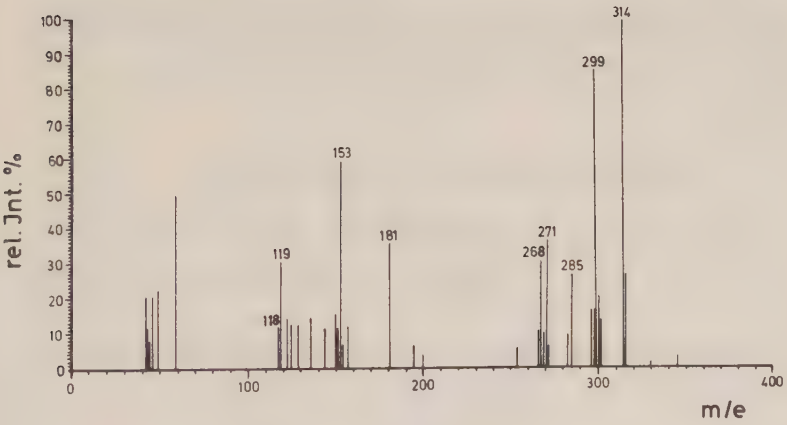
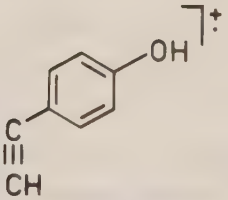


Abb. 12 : Massenspektrum von Substanz 10 (168 °C)

Aus dem Massenspektrum ergibt sich für das Flavon ein Molekulargewicht von 314. Das Molekülion M^+ selbst bildet den base peak (rel. Int. 100 %) des Spektrums. Bei einem Vergleich der Massenspektren des oben bereits beschriebenen 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 (vgl. S.31 ff.)

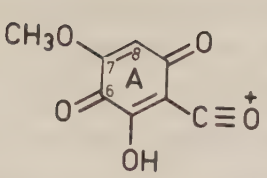
und des in seiner Struktur noch zu bestimmenden Flavons 10 ist weitgehende Übereinstimmung in dem Fragmentierungsverhalten festzustellen. Auch dieses Flavon nimmt offensichtlich unter Abspaltung einer Methylgruppe aus dem Molekülion M^+ die stabile Form eines Chinonkations an, erkennbar an dem mit hoher Intensität erscheinenden Peak m/e 299 (M-15). Der weitere Zerfall führt dann in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion zu den beiden Schlüsselbruchstücken m/e 181 und m/e 119, die für die Strukturbestimmung des Flavongerüsts von großer Bedeutung sind.

Bei dem Fragment m/e 119 sollte es sich wiederum um das schon auf Seite 34 beschriebene Phenylacetylenion m/e 118 + 1 handeln:



m/e 118

Das als Chinon vorliegende Bruchstück m/e 181 besitzt, ebenso wie das Molekülion M^+, eine um dreißig Einheiten geringere Massenzahl als das analoge, beim Zerfall des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 entstehende Fragment m/e 211, so daß für das Chinon m/e 181 folgende Struktur sinnvoll erscheint:



m/e 181

Es bleibt allerdings dabei offen, ob der Benzoylring (Ring A) an den C-Atomen 6 und 7, 6 und 8 oder 7 und 8 durch die beiden Methoxylgruppen substituiert ist.

2.2.3.6.4. ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung

Die genaue Stellung der Substituenten sollte aus dem ^{1}H-Kernresonanzspektrum hervorgehen.

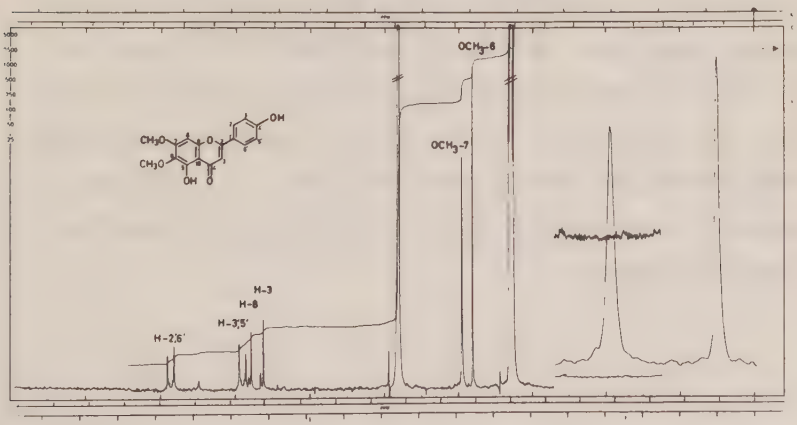


Abb. 13 : ^{1}H-NMR-Spektrum von Substanz 10 in CD_3OD
(Dehnung 100 Hz im Bereich der Methoxylgruppen)

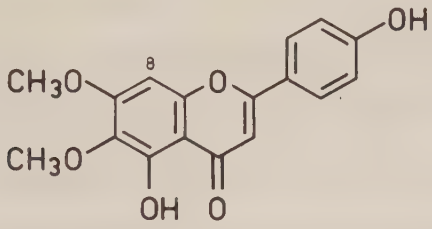
Das in Tetradeuteromethanol aufgenommene Spektrum gibt die ein AA'BB'-System kennzeichnende Anordnung von vier Signalen bei δ = 6,88 und δ = 6,97 ppm (H-5' und H-3') und bei δ = 7,84 und δ = 7,93 ppm (H-6' und H-2') wieder [35], hervorgerufen durch den para-disubstituierten Benzolring. Wie schon bei dem oben besprochenen Naturstoff erwähnt (vgl. S. 37), kann auch hier die genauere Zuordnung der vier Ringprotonen aus dem Einfluß der Hydroxylgruppe auf die Elektronendichte in ortho- bzw. meta-Stellung abgeleitet werden.

Das H-3-Proton und das am Benzoylring des Flavongerüsts verbleibende Proton erscheinen als zwei scharfe Singuletts bei δ = 6,65 und δ = 6,81 ppm, deren genaue Zuordnung auf Seite 60 gegeben wird.

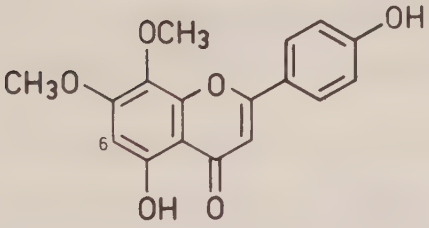
Die beiden Methoxylgruppen kommen bei δ = 3,83 und δ = 3,97 ppm zur Resonanz. Dehnung des Spektrums im Bereich der Methoxylgruppen macht deutlich, daß diese sich in der Halbwertsbreite ihrer Resonanzsignale voneinander unterscheiden. Eine symmetrische Anordnung der Methoxylgruppen zum Proton am Ring A, das heißt Substitution an C-6 und C-8, kann also ziemlich sicher ausgeschlossen werden. Das breitere der beiden Signale, das, wie aus dem Spektrum ersichtlich, bei tieferem Feld (δ = 3,97 ppm) erscheint, sollte demnach der Methoxylgruppe in 7-Stellung zugeordnet werden.

2.2.3.7. Strukturvorschlag von Flavon 10

Die aus den verschiedenen Untersuchungen gewonnenen und miteinander kombinierten Ergebnisse lassen für das zweite isolierte Flavon mit dem Molekulargewicht 314 und der Summenformel $C_{17}H_{14}O_6$ die folgenden beiden Möglichkeiten der Strukturbeschreibung zu:



5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon



5,4'-Dihydroxy-7,8-dimethoxyflavon

2.2.3.6.5. Vergleichende Untersuchungen mit synthetisiertem Flavon 10a

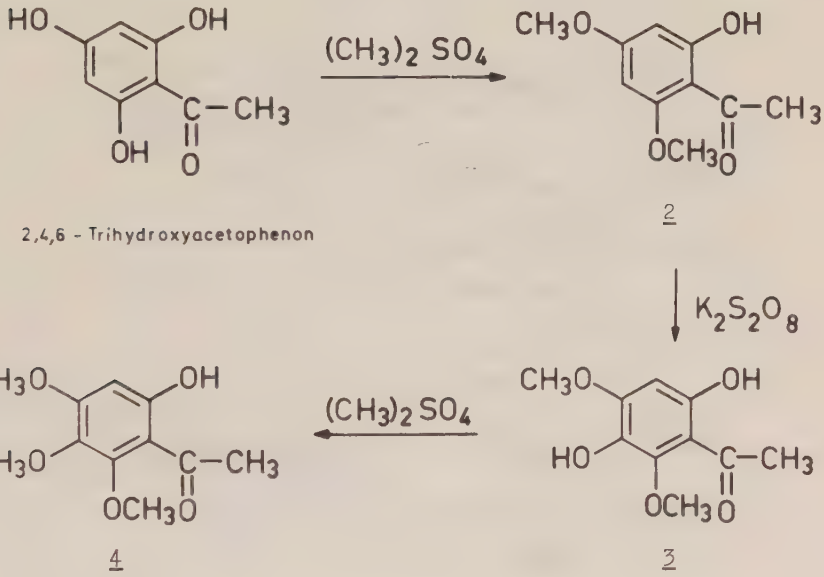
2.2.3.6.5.1. Synthese von Flavon 10a

Zur Unterscheidung der verbleibenden beiden Strukturmöglichkeiten, bei denen die Methoxylgruppen in Nachbarstellung zueinander stehen, sollte der Beweis der An- oder Abwesenheit eines Protons am C-6 genügen. Die Aufnahme eines ^{13}C-NMR-Spektrums in einem Lösungsmittel, in dem das Proton der 5-Hydroxylgruppe des Flavons nicht austauscht, müßte bei vorhandenem Proton in 6-Stellung für das Resonanzsignal des C-6 neben der großen ^{1}J-Kopplung zu einem Dublett eine zusätzliche durch das Hydroxylproton hervorgerufene kleine Kopplung zu erkennen geben. Durch Austausch gegen Deuterium würde diese in der Größenordnung von etwa 5 - 8 Hz liegende Kopplung aufgehoben [41]. Da allerdings die isolierte Substanzmenge nur wenige Milligramm betrug, scheiterte der Versuch an der zu geringen Konzentration der Meßlösung.

Einen gangbaren Weg schien die Synthese eines der beiden Konstitutionsisomeren zu bieten, um dann durch Vergleich der Meßdaten von synthetisiertem und natürlich vorkommendem Flavon die Substituentenanordnung am Benzoylring klären zu können.

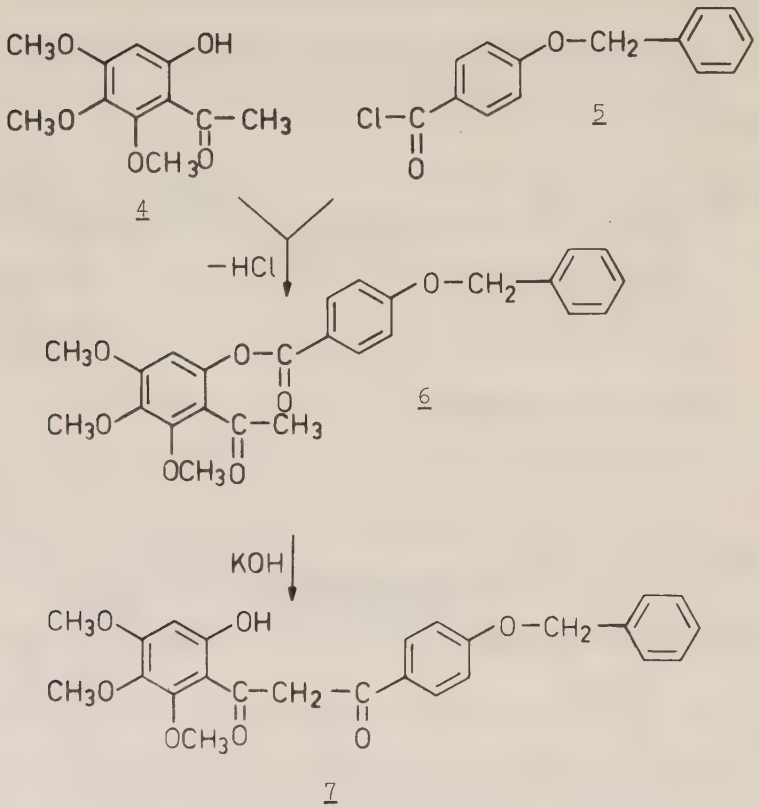
In Anlehnung an eine von Fukui, Matsumoto und Kinoshita [42] beschriebene Flavonsynthese wurde das 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10a, das Isomer also mit dem Proton am C-8, dargestellt.

Bei der Synthese wird das dem Benzoylring des gewünschten Flavons in der Substitution entsprechende Acetophenon mit p-Benzyloxybenzoylchlorid, das die Konstitution des Seitenphenylrings festlegt, zum Benzoat umgesetzt. Die Darstellung des erforderlichen 2-Hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenons erfolgte analog der Beschreibung von Sastri und Seshadri [43].



Ausgehend vom 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (Phloroacetophenon) werden im ersten Reaktionsschritt die Hydroxylgruppen in 4- und 6-Stellung mit Dimethylsulfat in basischem Milieu unter Wasserausschluß methyliert. Anschließend führt man wiederum im Alkalischen und bei konstant auf 15 °C gehaltener Temperatur durch Zugabe von Persulfat in die 5-Position eine Hydroxylgruppe ein, die nach Isolierung der Zwi-

schenstufe 3 durch Kochen mit Dimethylsulfat zum gewünschten 2-Hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenon 4 weiterreagiert.

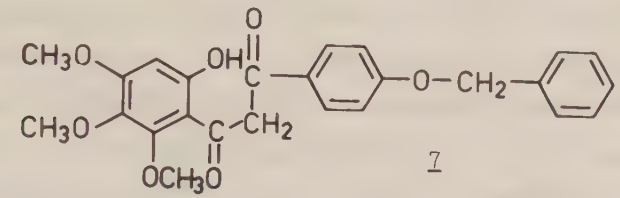


Dieses Produkt wird nun mit p-Benzyloxybenzoylchlorid 5 - hergestellt durch Erhitzen eines Gemisches aus p-Benzyloxybenzoesäure 5a und Thionylchlorid - in trockenem Pyridin zum 2-Aroyloxyacetophenonderivat 6 umgesetzt, das im gleichbleibenden Lösungsmittel unter Einwirken von Kaliumhydroxid

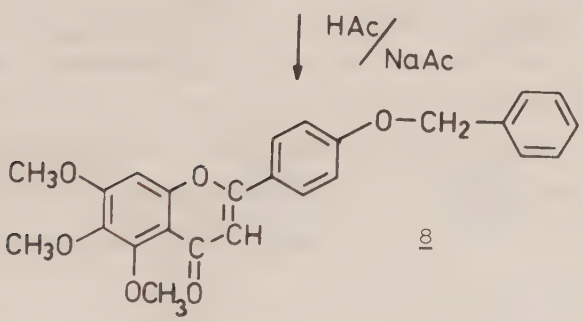
bei einer Temperatur von etwa 50 °C einer Baker-Venkataraman-Umlagerung zum Diketon 7 unterliegt [44].

Wheeler und andere [45] konnten nachweisen, daß die Verschiebung des Aroylrests auf einer intramolekularen Claisen-Kondensation beruht.

Die nachfolgende Ringschließung des Diketons zum Flavongerüst gelingt durch Erhitzen in Essigsäure.

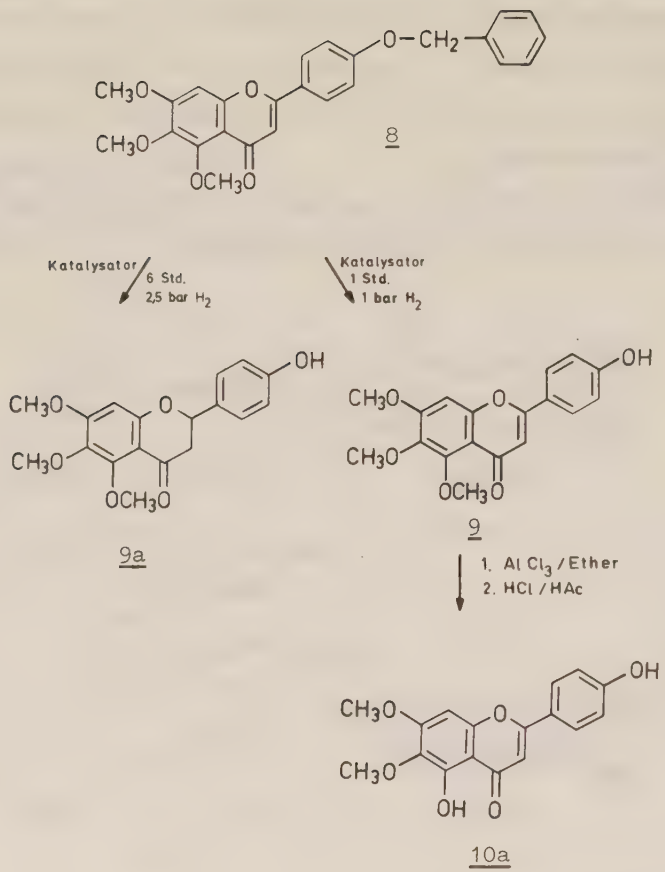


7



8

Die letzten beiden Syntheseschritte dienen der Abspaltung der zuvor eingeführten Schutzgruppen. Die Benzylgruppe läßt sich durch Schütteln der Substanz in Wasserstoffatmosphäre bei Gegenwart von Palladium-Aktivkohle entfernen; die Methoxylgruppe am C-5 wird durch längeres Sieden zunächst mit



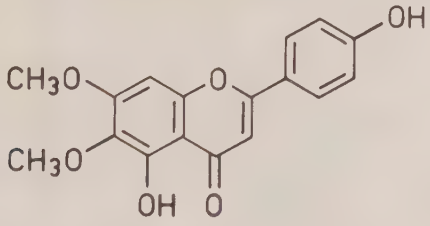
wasserfreiem Aluminiumchlorid in trockenem Ether, anschließend mit einem Gemisch aus konzentrierter Salz- und Essigsäure in die freie Hydroxylgruppe des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxy-flavons 10a übergeführt.

2.2.3.6.5.2. Vergleich der IR-Daten

Wie allgemein bekannt, ist das IR-Spektrum einer Substanz durch Lage und Intensität der meist zahlreichen Absorptionsbanden von hoher Spezifität. Über die häufig auftretenden Absorptionen funktioneller Gruppen hinaus erscheinen Schwingungsfrequenzen der Gerüstkohlenstoffatome eines Moleküls in dem auch als "Fingerprint-Gebiet" bezeichneten Wellenzahlbereich zwischen etwa 1500 und 1000 cm^{-1} in für die Verbindung charakteristischer Weise. Bei übereinstimmenden IR-Absorptionen zweier Proben sollte somit dieselbe Struktur zugrunde gelegt werden dürfen.

Die IR-Spektren von synthetisierter und aus Ocimum viride isolierter Substanz (vgl. S. 48) sind deckungsgleich, so daß das einzelne Proton am Benzoylring des Flavons offensichtlich die C-8-Stellung bekleidet; die beiden Methoxylgruppen nehmen die benachbarten Positionen 6 und 7 ein.

Der Naturstoff 10 besitzt also die Struktur des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons.



5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon

2.2.3.6.5.3. Diskussion der ^{1}H-NMR-Spektren

Die Auswertung der ^{1}H-NMR-Messung bestätigt die Anordnung der Methoxylgruppen an den C-Atomen 6 und 7; die ppm-Werte der beiden auf unterschiedlichen Wegen gewonnenen Proben sind vollkommen identisch (vgl. S.51).

Für die genauere Zuordnung der Singuletts bei δ = 6,65 und δ = 6,81 ppm (vgl. S.52) erweist sich das ß-Diketon 7 (vgl. S.57), ein Zwischenprodukt der Synthese, als sehr wertvoll. Werden nämlich die beiden aciden Protonen der Methylenbrücke R-C(=O)-CH$_2$-C(=O)-R' gegen Deuterium ausgetauscht und wird anschließend der Ringschluß in Deuteroessigsäure vollzogen, so erscheint im Gegensatz zur nicht deuterierten cyclisierten Verbindung in dem interessierenden ppm-Bereich des

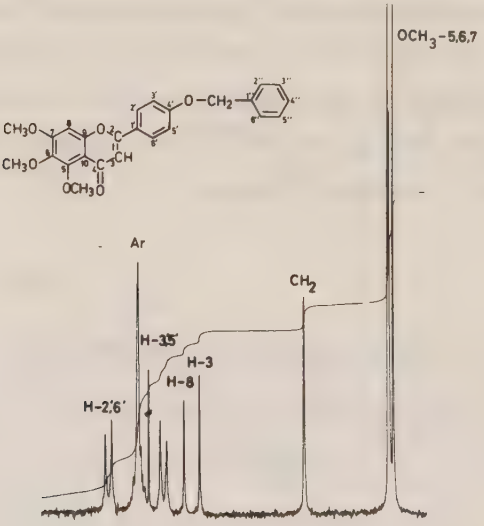


Abb. 14 : ^{1}H-NMR-Spektrum von 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-H-flavon 8 in $CDCl_3$

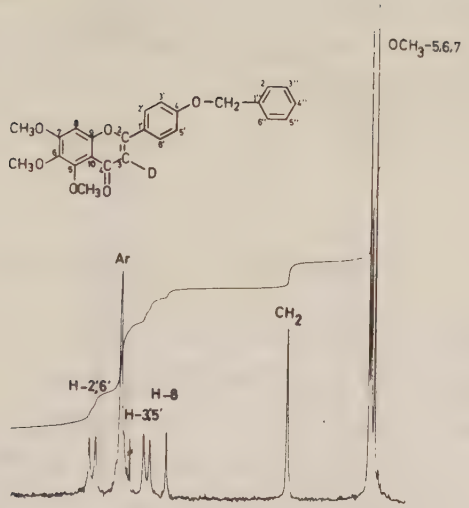


Abb. 15 : ^{1}H-NMR-Spektrum von 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-D-flavon 8a in $CDCl_3$

NMR-Spektrums nur noch ein einziges Singulett bei δ = 6,75 ppm, das allein durch das Proton am C-8 hervorgerufen werden kann.

In dem NMR-Spektrum des Flavons 10 (vgl. S.52) ist daher mit ziemlicher Sicherheit das Signal bei tieferem Feld, δ = 6,81 ppm, dem Proton am C-8 zuzuordnen, während das Proton am C-3 bei δ = 6,65 ppm zur Resonanz kommt.

Als Nebenprodukt der Synthese entstand bei dem Versuch, die Benzylgruppe durch Hydrogenolyse abzuspalten, unter den zunächst gewählten Bedingungen - 6stündige Reaktionszeit, 2,5 bar Wasserstoff - das 4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon 9a (vgl. S.58).

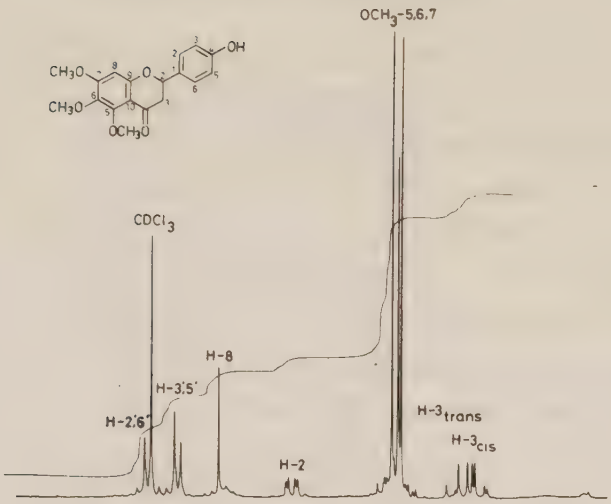


Abb. 16 : ^{1}H-NMR-Spektrum von 4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon 9a in $CDCl_3$

Die Hydrierung der olefinischen Doppelbindung führt im ^{1}H-NMR-Spektrum zu neu auftretenden Signalen im Alkanbereich. Die beiden Protonen am C-3 und das einzelne Proton am C-2 bilden durch Kopplung untereinander ein aus 12 Linien bestehendes Dreispin-System aus, das als ABX-System bezeichnet wird. Das Proton am C-2, das sich von den geminalen Protonen des C-3 in seiner chemischen Verschiebung deutlich unterscheidet, liefert durch Kopplung mit diesen den aus 4 Signalen bestehenden X-Teil des ABX-Systems mit dem Zentrum bei δ = 5,32 ppm und den Kopplungskonstanten J_{BX} und J_{AX} von 4 Hz bzw. 12 Hz. Die nicht äquivalenten, in ihrer chemischen Verschiebung nur wenig unterschiedenen Protonen am C-3 bilden

den aus 8 Signalen aufgebauten AB-Teil des ABX-Systems mit den Resonanzmittelpunkten bei δ = 3,08 ppm für das H-3 trans und δ = 2,78 ppm für das H-3 cis. Die Kopplungskonstante J_{AB} beträgt 16 Hz.

2.2.3.6.5.4. Diskussion der ^{13}C-NMR-Spektren

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons 10a zeigt verglichen mit dem des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 (vgl. S.37) die durch das Fehlen der Methoxylgruppe in 8-Stellung zu erwartenden Änderungen in Lage, Aufspaltung und Intensität der Signale.

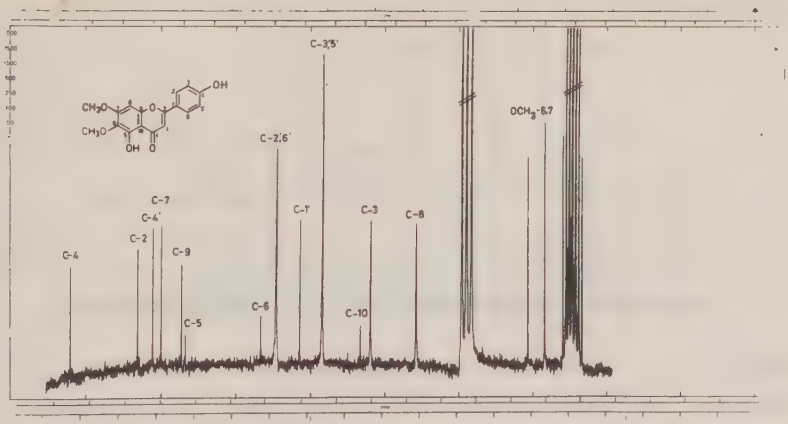


Abb. 17 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10a in $CDCl_3/CD_3OD$ (3:1), ^{1}H-entkoppelt

Das Resonanzsignal des tertiären C-8 erscheint bei δ = 91,10 ppm und spaltet im gekoppelten Spektrum infolge ^{1}J-Kopplung zu einem Dublett auf. Die Zunahme der Signalintensität sowohl für das Signal des C-7 bei δ = 159,03 ppm als auch für das des C-9 bei δ = 153,63 ppm ist auf den durch das H-8 hervorgerufenen Kern-Overhauser-Effekt zurückzuführen. Die Hochfeldverschiebung der Absorptionen von C-7 und C-9 wird durch den Verlust der Methoxylgruppe in 8-Stellung erklärt.

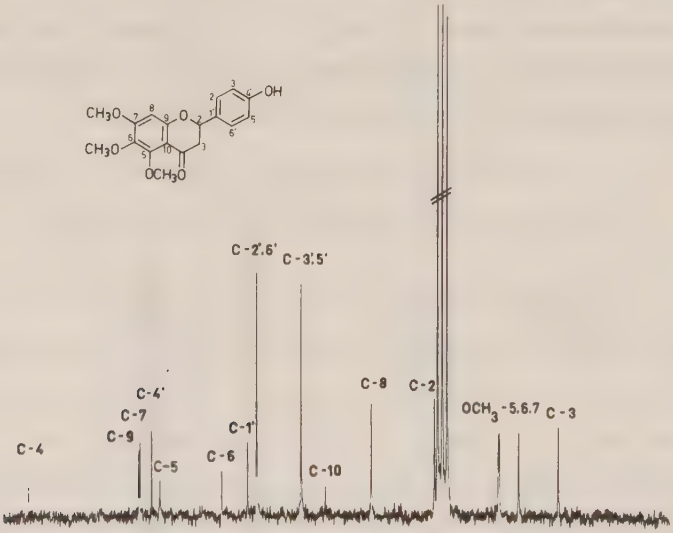


Abb. 18 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon 9a in $CDCl_3$, ^{1}H-entkoppelt

Im ^{13}C-NMR-Spektrum des an der olefinischen Doppelbindung hydrierten 4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavons 9 (vgl. S. 58) absorbieren die C-Atome 2 und 3 in dem für sp^3-hybridisierte Kohlenstoffatome charakteristischen ppm-Bereich bei δ= 79,16 und δ= 45,27 ppm. Das Resonanzsignal des sekundären C-3 spaltet im gekoppelten Spektrum zu einem Triplett auf, das des tertiären C-2 zu einem Dublett.

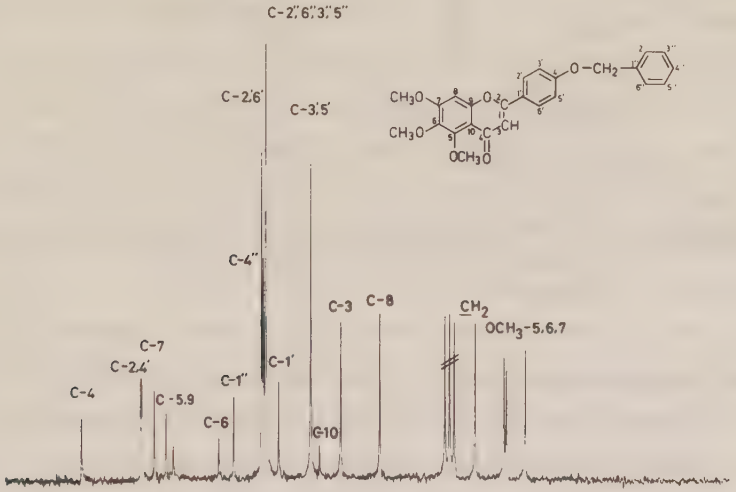


Abb. 19 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-H-flavon 8 in $CDCl_3$, ^{1}H-entkoppelt

Die Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Spektren von 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-H-flavon 8 und 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-D-flavon 8a ermöglichte eine sichere Zuordnung der beiden im gekoppelten Spektrum zu Dubletts aufgespalte-

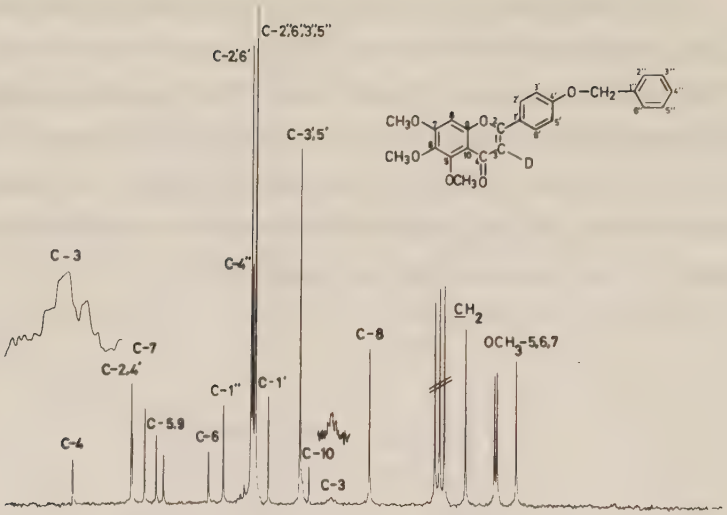


Abb. 20 : ^{13}C-NMR-Spektrum von 4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-D-flavon 8a in $CDCl_3$, ^{1}H-entkoppelt

nen Resonanzsignale von C-3 und C-8. Das Signal bei δ = 106,88 ppm erscheint bei der deuterierten Verbindung nur als schwach angedeutetes Triplett - Deuterium hat den Kernspin 1 - , so daß dieses das C-3 beschreiben muß. Das Signal des C-8 bei δ = 96,14 ppm bleibt hingegen unverändert.

2.2.3.8. Vorkommen weiterer Flavone

Die Massenspektren von Rohsubstanzen der beiden Flavone 1 und 10 (vgl. S.32 und S.49) lassen erkennen, daß sowohl das 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 ($M^{\cdot+}$ 344) als auch das 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10 ($M^{\cdot+}$ 314) mit Spuren einer Substanz vergesellschaftet ist, die jeweils eine um dreißig Einheiten höhere Masse besitzt. Außer diesen vielleicht als weitere Molekülionen zu interpretierenden, nur als sehr kleine Spitzen angedeuteten Signalen bei m/e 374 bzw. m/e 344 kann lediglich ein einziges Fragment bei m/e 359 ($M^{\cdot+}$ 374-15) bzw. m/e 329 ($M^{\cdot+}$ 344-15) ausgemacht werden. Es wäre vorstellbar, daß es sich dabei um in sehr viel geringerer Konzentration vorliegende Flavone handelt, die entweder am C-3 oder am Seitenphenylring eine zu den beschriebenen Strukturen zusätzliche Methoxylgruppe tragen. Leider gab keine der anderen spektroskopischen Untersuchungen irgendeinen näheren Hinweis. Es ist allerdings auszuschließen, daß die beiden isolierten Flavone selbst miteinander in einem Gemisch vorliegen, da beim 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 das Bruchstück m/e 329 (M-15) als base peak erscheint; beim 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10 hingegen bildet das Molekülion $M^{\cdot+}$ 329 den Peak mit der höchsten relativen Intensität.

2.2.3.9. Quantitative Bestimmung

Die hier durchgeführte quantitative Bestimmung der Flavonoide kann nur als eine Näherung an den tatsächlichen Gehalt in der Pflanze betrachtet werden. Die Ermittlung erfolgte durch UV-Absorptionsmessung; der Flavonoidgehalt wurde insgesamt auf 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 umgerechnet.

Nach Anleitung von Christ und Müller [46] wurde für die Herstellung der zu vermessenden Probe gepulverte Droge in einer Mischung aus Aceton und Salzsäure zur Spaltung möglicher Glykosidbindungen unter Rückfluß gekocht, mehrere Male mit Aceton extrahiert und der Auszug mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Eine abgemessene Menge dieser zuvor auf ein genaues Volumen aufgefüllten Ethylacetatlösung wurde zur Trockne eingedampft, in Methanol aufgenommen und zur Entfernung des Chlorophylls durch sogenannte Phasenbrechung mit gleichen Teilen Wasser und Chloroform versetzt.

Zur Ermittlung des Flavonoidgehalts der Probe dienten Eichgeraden, dargestellt aus Extinktionsmessungen bei λ = 283 nm und λ = 332 nm von Lösungen des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 bekannter Konzentration, wobei die Konzentration gegen die Extinktion aufgetragen wurde (vgl. Abb. 21).

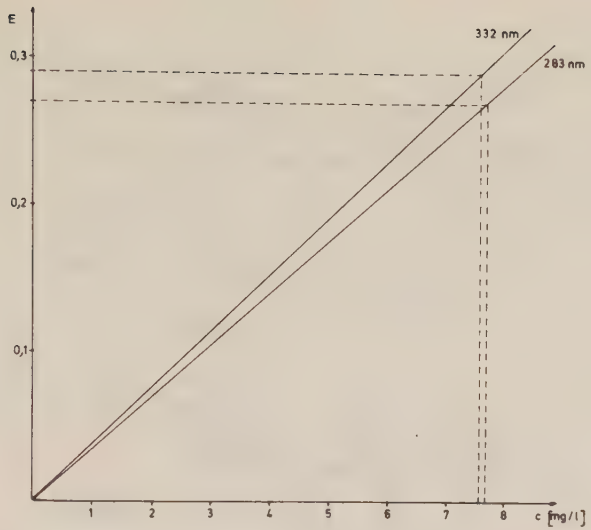
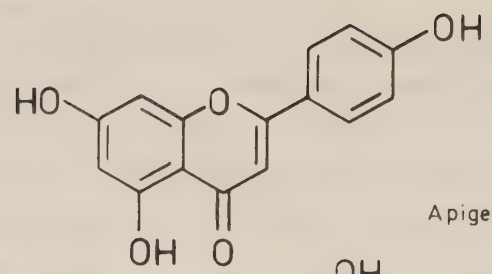


Abb. 21 : Eichgeraden von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1

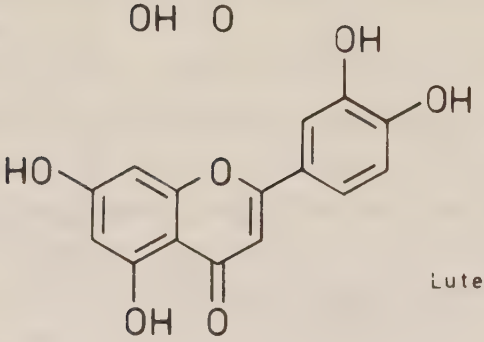
Die bei λ = 283 nm und λ = 332 nm gemessenen Extinktionen der Probenlösung geben für Ocimum viride einen mittleren Flavonoidgehalt von 0,19 Prozent an, bezogen auf 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1.

2.2.3.10. Literaturangaben zu den isolierten Flavonen

In der Familie der Lamiaceae werden vornehmlich Flavone vom Apigenin- und Luteolin-Typ aufgefunden [15]. Die aus Ocimum viride isolierten Flavone, deren Seitenphenylring lediglich durch eine Hydroxylgruppe in 4'-Stellung substituiert ist, gehören der Apigenin-Reihe an.



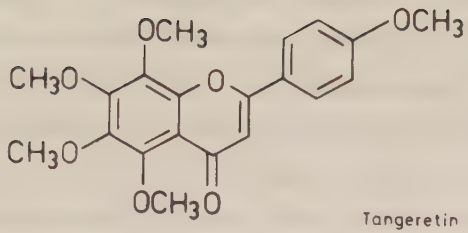
Apigenin



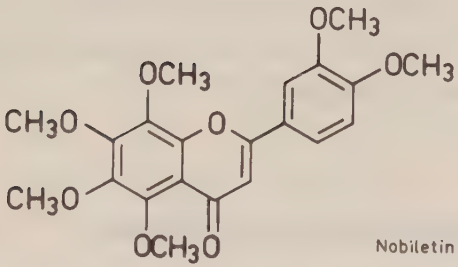
Luteolin

Nach Hänsel [47] ist die Ausbildung von methoxylierten Flavonen an Pflanzen mit Exkretionsorganen gebunden, wie zum Beispiel an Verbenaceen, Rutaceen, Asteraceen oder Lamiaceen. Wesentlich häufiger als in Pflanzen aus der Familie der Lamiaceae wird das Vorkommen von methoxylierten Verbindungen, wie Tangeretin und Nobiletin, in Rutaceenarten beobachtet [47].

Das in Ocimum viride gefundene 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 wurde erstmals von Stout und Stout [48] 1961 aus Satureia douglassii Benth. isoliert und als Xanthomicrol benannt. Ein weiteres Mal erwähnt wurde diese Verbindung von Pinkas und Mitarbeitern [49] 1967, die ver-



Tangeretin



Nobiletin

schiedene Citrusarten (Rutaceae) auf das Vorkommen von Flavonoiden hin überprüft haben. Das Schwergewicht ihrer Arbeit lag allerdings in der Untersuchung der fungiziden Wirkung der methoxylierten Flavone gegenüber Deuterophoma tracheiphila Petri, dem Erreger von Mal-secco. Bei dieser Krankheit, die Citrusarten befällt, durchdringt der Pilz das Gefäßsystem der Pflanzen und führt schließlich zu ihrem völligen Absterben. Das 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon (Xanthomicrol) vermindert das Wachstum von Deuterophoma tracheiphila um etwa zehn bis zwanzig Prozent.

Das 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10 liegt in glykosidischer Form in einigen Cirsiumarten (Asteraceae) vor. So gelang es 1963 Morita und Shimizu [50] dieses Flavon als 4'-O-glucosid in Cirsium maritimum, 1970 Wallace und Bohm [51] als 4'-O-rutinosid in Cirsium brevistylum nachzuweisen. Das Aglykon selbst wurde von Geissman [52] 1967 unter dem Namen Cirsimaritin aus Helichrysum viscosum var. bracteatum isoliert. Das Vorkommen von Cirsimaritin in Lamiaceenarten wurde 1970 zum ersten Mal erwähnt. Brieskorn und Biechele [53] wiesen es in Salvia officinalis nach und gaben ihm die synonyme Bezeichnung 6-Methoxygenkwanin.

2.2.3.11. Pharmakologische Untersuchung

Pharmakologisch untersucht wurde nur das 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1.

Im Papierblättchentest nach May (vgl. S. 12) erweist sich dieses Flavon ebenso wie das Thymol als unwirksam gegenüber Herpes-, Influenza- und Vaccineviren.

Dieses Ergebnis wird gestützt durch Versuche, die im Rahmen einer allgemeinen Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften des Flavons im Bristol Laboratorium (New York) durchgeführt wurden. Die dort darüberhinaus gemachten in vitro Versuche zur Ermittlung möglicher bakteriostatischer oder fungizider Wirksamkeit verliefen ebenfalls negativ. Allerdings steht dieses letzte Ergebnis im Widerspruch zu

der Aussage von Pinkas [49] (vgl. S.71), daß der Pilz Deuterophoma tracheiphila Petri in seinem Wachstum durch 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon beeinträchtigt würde.

Schließlich bot sich noch am Marburger Institut für Pharmakologie und Toxikologie die Gelegenheit, etwaige Veränderungen in der Diuresetätigkeit bei Ratten durch Flavongaben beobachten zu lassen. Leider nimmt das Flavon auch hierauf keinen Einfluß.

III Zusammenfassung

Die Inhaltsstoffe der in Togo heimischen Lamiaceae Ocimum viride werden unter Berücksichtigung der beobachteten antiviralen Eigenschaften dieser Pflanze näher untersucht. Dabei liegt der Schwerpunkt der Forschungsarbeit bei den phenolischen Verbindungen, insbesondere bei den Flavonoiden; Saponine, Gerbstoffe und ätherisches Öl werden im Rahmen einer Stoffgruppenübersicht betrachtet.

Aus der Reihe der Phenolcarbonsäuren führt Ocimum viride 3,4-Dihydroxyzimtsäure, die als wesentlicher Baustein der Lamiaceengerbstoffe gilt.

Die positiv verlaufenden qualitativen Farbreaktionen auf Flavonoide geben Anstoß zur Isolierung einzelner Vertreter dieser Gruppe. Durch Anwendung von präparativer Papierchromatographie, Säulenchromatographie auf Polyamid und Umkehrphasenchromatographie gelingt es, zwei Flavone so weit anzureichern und zu reinigen, daß deren Struktur aufgeklärt werden kann. Die Auswertung der in Beziehung zueinander gesetzten Meßwerte der UV-, IR-, MS-, ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-spektroskopischen Untersuchungen legt für Flavon 1 die Struktur des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons fest, für Flavon 10 die eines 5,4'-Dihydroxyflavons mit zwei Methoxylgruppen am Ring A. Die Substitution des letzteren Flavons an den C-Atomen 6 und 7 wird gesi-

chert durch die Synthese des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons 10a und anschließenden Vergleich der IR- und ^{1}H-NMR-spektroskopischen Daten.

Der wäßrige Drogenauszug von Ocimum viride zeigt im Papierblättchen Test nach May schwache antivirale Aktivität, die vermutlich auf der Anwesenheit von Lamiaceengerbstoffen beruht. Die pharmakologische Untersuchung des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1, die nur in sehr bescheidenem Umfang durchgeführt werden konnte, deuten hingegen keine virustatische, bakteriostatische oder fungizide Wirksamkeit an.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät nach Linström bestimmt und sind unkorrigiert angegeben.

Die Aufnahmen der UV-Spektren erfolgten mit dem Spektrophotometer Acta M VI der Fa. Beckman. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima sind in nm angegeben.

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrometer 257 der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen. Charakteristische Banden sind in der Einheit cm^{-1} angegeben. Ihre Intensitäten werden durch die Abkürzungen s (strong), m (middle) und w (weak) bezeichnet.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an dem Gerät Varian-MAT 111 bei 80 eV durchgeführt.

Für die Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren standen die Kernresonanzspektrometer T-60, XL-100 A-15 (mit Nicolet TT 100 Fourier-System) der Fa. Varian und JNM-FX-100 der Fa. Jeol zur Verfügung. Bei den Aufnahmen am T-60 diente TMS als innerer Standard, bei den am XL-100 und FX-100 stellte das Lösungsmittel selbst den Eichpeak (Zentrum des Multipletts). Die Verschiebungswerte in ppm beziehen sich auf die δ-Skala. Folgende Abkürzungen werden verwendet: s = Singulett, m = Multiplett und bs = breites Signal.

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern XL-100 A-15 und JNM-FX-100 aufgenommen. Als innerer Standard dienten die Lösungsmittelsignale des $CDCl_3$ bzw. CD_3OD. Die Ver-

schiebungswerte sind in ppm (δ-Skala) angegeben.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach den Vorschriften des Organikums, 9. Auflage, Berlin 1969, gereinigt und getrocknet.

Herkunft und Anbau der untersuchten Pflanzen

Pflanzen, die in Lomé (Togo) in einem Privatgarten gezogen wurden, lieferten das Samengut für die Aussaat von Ocimum viride in geschlossenen Gewächskästen des Botanischen Gartens der Philipps-Universität Marburg. Nach Ablauf der ersten Vegetationsperiode wurden die Pflanzen in offene Kästen umgesetzt. Die Vermehrung erfolgte durch Ziehen von Stecklingen.

Ernte und Trocknung

Von April bis Ende Oktober wurden die oberirdischen Pflanzenteile von Ocimum viride in regelmäßigen Abständen geerntet und im Umlufttrockenschrank (Heraeus Typ TU 1) bei 35 °C getrocknet. Der Grobzerkleinerung des trockenen Pflanzenguts diente eine Schlagwerkmühle, der Gewinnung des feinen Drogenpulvers eine mit Wasserkühlung ausgestattete Drogenmühle.

Herstellung der Extrakte

Extrakt a:

In Anlehnung an die im DAB 7 gegebene Herstellungsvorschrift für Aufgüsse wurden 2,0 g Drogenpulver mit 10 g Wasser mazeriert, nach 15 Minuten mit 90 g heißem Wasser übergossen und 10 Minuten lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der auf 30 °C abgekühlte Extrakt wurde abgesaugt

und der Drogenrückstand mit wenig kaltem Wasser gewaschen.

Extrakt b:

4 g feingepulverte Droge wurden 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in 100 ml einer Methanol-Wasser-Mischung (1:1) gerührt. Nach Absaugen vom Pflanzenmaterial wurde das klare Filtrat im Wasserstrahlpumpenvakuum zur Trockne eingeengt, der Rückstand in wenigen ml Methanol-Wasser (1:1) aufgenommen und die Lösung auf das obere Ende einer kurzen Polyamidsäule (1 x 10 cm, Polyamid-S 6 für Säulen-Chromatographie, Riedel-De Haën) gebracht. Die Elution erfolgte zunächst mit 100 ml Wasser, anschließend mit 100 ml Methanol-Wasser (1:4). Die vereinigten Eluate gelten als Extrakt b.

Extrakt c:

25 g feingepulverte Droge wurden in 200 ml einer Methanol-Wasser-Mischung (3:1) 3 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Drogengut wurde auf einer Porzellanfritte gesammelt, das Filtrat am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 50 ^{o}C eingeengt und der Eindampfrückstand in 100 ml Methanol-Wasser (1:1) gelöst.

Nachweisreaktionen zur qualitativen Analyse der Droge

Prüfung auf Saponine:

Schüttelschaumprobe:

0,5 g gepulverte Droge wurden mit 10 ml heißem Wasser übergossen und nach Abkühlung auf Raumtemperatur 10 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Der dabei entstandene Schaum blieb auch auf Zusatz von 10 Tropfen 2N-Salzsäure bestehen.

Hämolyseversuch:

0,5 g gepulverte Droge wurden in 50 ml Phosphatpufferlösung pH 7,4 aufgekocht und nach Erkalten abfiltriert.
1 ml des klaren Filtrats wurde mit 1 ml einer frisch bereiteten 2%igen Blutaufschwemmung versetzt.

Für die Blutaufschwemmung wurden 10 ml Natriumcitratlösung, hergestellt durch Lösen von 3,65 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5\ 1/2\ H_2O$ in 100 ml Wasser, mit frischem Rinderblut zu 100 ml aufgefüllt und gut gemischt. Die Zubereitung der 2%igen Blutaufschwemmung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch durch Verdünnen von 2,00 ml Citratblut mit Phosphatpufferlösung pH 7,4 zu 100 ml.

Prüfung auf Gerbstoffe:

Fällungsreaktionen mit Bleiacetat- bzw. Strychninnitratlösung:

0,5 g gepulverte Droge wurden in 50 ml Wasser kurz zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen durch ein Faltenfilter gege-

ben. Das geteilte Filtrat wurde mit einigen Tropfen Bleiacetat- bzw. Strychnin-Natriumchloridlösung versetzt.

Die Herstellung der Reagenzlösungen erfolgte durch Lösen von 9,48 g $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3\ H_2O$ bzw. von 1,20 g Strychninnitrat und 1,0 g NaCl in Wasser zu 100 ml.

Prüfung auf Flavonoide:

Farbreaktionen nach Shinoda und Wilson

0,5 g feingepulverte Droge wurden in 10 ml Methanol 15 Minuten lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der noch heiße Extrakt wurde filtriert und mit 10 ml Wasser verdünnt. Die erkaltete Lösung wurde mit 5 ml Petrolether geschüttelt und die wäßrig-methanolische Phase am Rotationsverdampfer schonend eingeengt. Der Rückstand wurde in 4 ml Ethanol aufgenommen und die Lösung in zwei Teile geteilt. Für die Farbreaktion nach Shinoda wurde die eine Hälfte der Prüflösung mit 0,2 g Magnesiumspänen und 2 ml konzentrierter Salzsäure versetzt; zur Durchführung der Farbreaktion nach Wilson wurde der andere Teil der Prüflösung zur Trockne eingedampft, mit wenigen Tropfen Aceton befeuchtet und unter Zusatz je einer Spatelspitze feingepulverter Bor- und Oxalsäure erneut auf dem Wasserbad zur Trockne eingeengt. Die Lösung des Eindampfrückstandes in 10 ml Ether wurde im UV-Licht (365 nm) betrachtet.

Prüfung auf Alkaloide:

Fällungsreaktionen mit Mayers Reagenz, Jodlösung bzw. Dragendorffs Reagenz

0,5 g feingepulverte Droge wurden in einer Mischung aus 1 ml 2N-Salzsäure und 9 ml Wasser 2 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Das nach dem Abkühlen gewonnene Filtrat wurde in drei Teile geteilt und mit 2-3 Tropfen Mayers Reagenz, Jodlösung bzw. Dragendorffs Reagenz versetzt.

Mayers Reagenz DAB 7: 1,355 g $HgCl_2$ + 5,00 g KJ zu 100 ml H_2O gelöst

Jodlösung DAB 7: 1,00 g J_2 + 2,00 g KJ zu 100 ml gelöst

Dragendorffs Reagenz nach Munier und Macheboeuf:

Lösung a: 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml HAc und 40 ml H_2O gelöst

Lösung b: 8 g KJ werden in 20 ml H_2O gelöst

Vor Gebrauch werden 0,5 ml Lösung a und 0,5 ml Lösung b mit 2 ml HAc und 10 ml H_2O gemischt.

Prüfung auf Bitterstoffe:

Geschmacksprobe:

0,2 g feingepulverte Droge wurden in 100 ml Leitungswasser aufgekocht. Nach dem Erkalten und Filtrieren wurde der Geschmack der Lösung geprüft.

Quantitative Bestimmung des ätherischen Öls

30,0 g grobgepulverte Droge wurden in den Destillationskolben der in Ziffer 85 DAB 7 beschriebenen Apparatur zur Bestimmung des ätherischen Ölgehalts eingewogen und nach Zugabe von 300 ml Wasser 2 Stunden lang destilliert. Da das ätherische Öl von Ocimum viride eine geringere Dichte als Wasser besitzt, erübrigte sich das Einbringen von Xylol in das Meßrohr. Es wurden drei Wertbestimmungen durchgeführt, aus deren Mittel sich ein Wert von 0,5 ml/100 g Droge ergibt:

Einwaage der Droge in g	Menge des ätherischen Öls in ml	Menge des ätherischen Öls in ml/100 g Droge
30,4	0,15	0,49
30,7	0,16	0,52
29,9	0,15	0,50

Prüflösungen für die pharmakologische Untersuchung im Papierblättchentest nach May:

Fällung von Extrakt a mit

1) Gelatine:

20 ml Extrakt a wurden unter Rühren tropfenweise mit 20 ml 2%iger wäßriger Gelatinelösung versetzt. Dabei blieb die zu erwartende Niederschlagsbildung aus. Weder Zusatz von höher konzentrierter (10%ig) Gelatinelösung, noch Aufbewahren im

Kühlschrank, noch allmähliches Erhitzen der Lösung konnte eine Fällung herbeiführen. Dasselbe Ergebnis wurde bei Einsatz von Extrakt b erzielt.

2) Bleiacetat

20 ml Extrakt a wurden bis zur quantitativen Fällung mit Bleiacetatlösung (Herstellung vgl. S. 84) versetzt. Der voluminöse Niederschlag wurde abgetrennt und das Filtrat zum pharmakologischen Test gegeben.

3) chromiertem Hautpulver

20 ml Extrakt a wurden mit 1,0 g Hautpulver (schwach chromiert zur Gerbstoffbestimmung, Merck) in einem Jodzahlkolben gut verschlossen geschüttelt. Nach scharfem Abzentrifugieren des Hautpulvers wurde die überstehende Lösung verwendet.

Thymollösung:

Da Thymol in Wasser sehr schwer löslich ist, dienten 20 ml einer unter Erwärmen hergestellten gesättigten Lösung als Prüflösung.

Flavonlösung:

Das 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon ist ebenfalls schlecht wasserlöslich, so daß auch das Flavon in Form einer gesättigten Prüflösung untersucht wurde.

Dünnschichtchromatographische Trennung von Hydroxyzimtsäuren

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte a und b auf Anwesenheit von Hydroxyzimtsäuren wurden Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten Merck verwendet. Entwickelt wurde - stets nach Kammersättigung und über eine Laufstrecke von 15 cm - in den folgenden drei Fließmittelsystemen:

I Toluol/Chloroform/Aceton (40:25:35)
II Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10)
III Benzol/Dioxan/Eisessig (90:25:4)

Zur Detektion wurden die Chromatogramme vor und nach Behandlung mit Ammoniakdämpfen im UV-Licht bei 365 nm betrachtet.

Das Vorliegen von 3,4-Dihydroxyzimtsäure in Extrakt a und b konnte durch Vergleich mit den hRF-Werten der gleichzeitig chromatographierten Reinsubstanz ermittelt werden:

Gegenüberstellung der hRF-Werte der reinen und der in der Droge vorliegenden 3,4-Dihydroxyzimtsäure

	Fließmittelsystem I	Fließmittelsystem II	Fließmittelsystem III
3,4-Dihydroxyzimtsäure (rein)	37	49	27
3,4-Dihydroxyzimtsäure (in der Droge)	35	48	26

Zweidimensionale Papierchromatographie des Flavonoidgemisches

Auf Whatman Chromatographiepapier Nr. 3, zugeschnitten auf 20 x 20 cm, wurde Extrakt c punktförmig in die linke Ecke, 2 cm vom seitlichen und unteren Rand entfernt, aufgetragen und im Fließmittel Tertiärbutanol/Eisessig/Wasser (60:20:20) über eine Laufstrecke von 12 cm in aufsteigender Richtung entwickelt. Das getrocknete Chromatogramm wurde um 90° gedreht und senkrecht zur 1. Laufrichtung im Fließmittelgemisch Eisessig/Wasser (85:15) chromatographiert (vgl. Abb. 3 S. 19).

Die Sichtbarmachung des im UV-Licht bei 365 nm dunkelrot erscheinenden Chromatogrammfleckens gelang entweder durch Ansprühen mit Bor-Oxalsäurelösung, hergestellt aus 3 Teilen 3%iger Borsäurelösung und 1 Teil 10%iger Oxalsäurelösung, (nach Erhitzen auf 130 °C Gelbfärbung) oder durch Ansprühen mit 1%iger methanolischer Lösung von Diphenylborsäure-ß-aminoethylester (Rotfärbung).

Anreicherung von Flavonoiden durch präparative Papierchromatographie

Nach der Herstellungsvorschrift für Extrakt c wurden in Ansätzen von je 100 g Drogenpulver insgesamt etwa 1 kg Droge verarbeitet und der absteigenden präparativen Papierchromatographie unterworfen. Der in Methanol-Wasser (3:1) aufgenom-

mene Eindampfrückstand des Extrakts c wurde auf Whatman Chromatographiepapier Nr. 3, 10 cm unterhalb des oberen Randes, als schmales Band aufgetragen und im Fließmittelsystem Eisessig/Wasser (85:15) entwickelt. Um ein gleichmäßiges Abtropfen der mobilen Phase zu erzielen, wurde der untere Rand der 23 x 50 cm großen Chromatographiepapierbögen zackenförmig eingeschnitten. Ein scharfer Knick 4 cm unterhalb des oberen Randes ermöglichte das Einhängen der Chromatogramme in die Fließmittelwanne. Jeweils 5 Chromatogramme konnten gleichzeitig entwickelt werden; die Laufzeit betrug 6 Stunden. Die Detektion der getrockneten Chromatogramme erfolgte wie auf Seite 20 beschrieben; die mit Bor-Oxalsäurelösung bzw. Diphenylborsäure-ß-aminoethylesterlösung anfärbbaren Zonen wurden in 1 cm^2 große Stückchen zerschnitten, diese mit Methanol-Wasser (3:1) eluiert und die eingeengte Lösung wurde erneut chromatographiert.

Isolierung von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1 durch Säulenchromatographie

Aus insgesamt etwa 1,5 kg gepulverter Droge hergestellter Extrakt c wurde in Anteilen von jeweils 5 g Eindampfrückstand auf Polyamid-6 S für Säulenchromatographie (Riedel-De Haën) chromatographiert. Der in Methanol-Wasser (1:1) aufgenommene Rückstand wurde auf Polyamid durch schonendes Verdampfen des Lösungsmittels aufgezogen, auf das obere Ende der unter ständigem Klopfen gefüllten Säule (3,5 x 25 cm) gebracht und mit

einer 3 cm hohen Schicht Sand bedeckt. Die Elutionsmittel wurden in der Reihenfolge Wasser, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % Methanol eingesetzt und nach nahezu farblosem Abtropfen der vorherigen Fraktion gewechselt.

Die aus dem mit 40%igem Methanol gewonnenen Eluat sich abscheidenden Kristalle wurden auf einer kleinen Trichterfritte gesammelt und bei einer Wasserbadtemperatur von 50 °C im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Isolierung von 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10 durch Umkehrphasenchromatographie

Das bei der säulenchromatographischen Trennung von Extrakt c über Polyamid mit 40%igem Methanol gewonnene Eluat wurde nach Absaugen der Kristalle von 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon eingeengt, der Rückstand in Methanol-Wasser (1:1) aufgenommen und auf Kieselgel 60 silanisiert (Merck) säulenchromatographiert (Säuleninnendurchmesser 3,7 cm, Säulenlänge 44 cm). Die genaue Versuchsanordnung und Beschreibung sind auf den Seiten 41ff. wiedergegeben.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des in Fraktionen getrennten Eluats erfolgte auf Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten (Merck) im Laufmittel Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure (50:40:10). Für die beiden Flavone wurden die folgenden hRF-Werte ermittelt: 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 49, 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 51.

Das aus Methanol-Wasser (1:1) auskristallisierende 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon wurde auf einer Trichterfritte gesammelt und bei einer Wasserbadtemperatur von 50 °C im Ölpumpenvakuum getrocknet.

UV-Absorptionsmessung der Flavone

Die UV-Messungen wurden in Quarz-Küvetten (d = 1 cm) durchgeführt; als Lösungsmittel diente Methanol für die Spektroskopie (Merck).

Die UV-spektroskopische Untersuchung der Flavone bestand aus jeweils 6 Messungen:

Messung I :	Lösung des Flavons in Methanol
Messung II :	wie I, unter Zusatz von 3 Tropfen Natriummethylatlösung
Messung III:	wie I, unter Zusatz von 6 Tropfen Aluminiumchloridlösung
Messung IV :	wie III, unter Zusatz von 3 Tropfen verdünnter Salzsäure
Messung V :	wie I, unter Zusatz von wasserfreiem Natriumacetat bis zur Sättigung (Aufnahme nach 2 Minuten)
Messung VI :	wie V, unter Zusatz von wasserfreier Borsäure bis zur Sättigung

Herstellung der Reagenzlösungen:

Natriummethylatlösung:

2,5 g frischgeschnittenes Natrium werden in kleinen Anteilen in 100 ml Methanol gelöst.

Aluminiumchloridlösung:

5 g wasserfreies Aluminiumchlorid werden vorsichtig in 100 ml Methanol gelöst.

Quantitative Bestimmung der Flavonoide

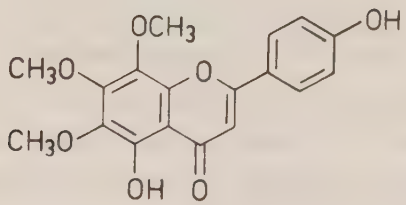
Der Gesamtflavonoidgehalt von Ocimum viride wurde durch UV-Absorptionsmessung bestimmt.

Zur Herstellung der Probenlösung wurden 0,1 g feingepulverte Droge, genau gewogen, in einer Mischung aus 20 ml Aceton und 2 ml 25%iger Salzsäure 30 Minuten lang unter Rückfluß erhitzt, filtriert und erneut zweimal mit je 20 ml Aceton unter Rückfluß extrahiert. Die klaren Auszüge wurden vereinigt und mit Aceton zu 100,0 ml aufgefüllt. 20 ml der Acetonlösung wurden nach Zusatz von 20 ml Wasser nacheinander mit 15 ml und dreimal mit je 10 ml Ethylacetat geschüttelt. Die gesammelte organische Phase wurde mit Ethylacetat zu 50,0 ml ergänzt. 10,0 ml dieser Lösung wurden zur Trockne eingedampft, in 5 ml Methanol aufgenommen und mit je 5 ml Wasser und Chloroform kräftig geschüttelt. Die chlorophyllfreie Phase wurde abgetrennt, zur Trockne eingeengt und in 10,0 ml Methanol gelöst. Die Extinktionen bei 332 und 283 nm wurden gemessen.

Zur Darstellung der Eichgeraden wurden methanolische Lösungen des 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavons 1 in den Konzentrationen 10^{-6} mol/l und $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l vorbereitet. Je 10,0 ml dieser Lösungen wurden in gleicher Weise behandelt wie 10,0 ml der Ethylacetatlösung der Probe. Die Extinktionswerte der Flavonlösungen bei 332 und 283 nm wurden gegen die Konzentration (mg/l) aufgetragen (vgl. S.69).

Aus den Extinktionen der Probe läßt sich mit Hilfe der Eichgeraden für Ocimum viride ein mittlerer Gehalt von 0,19 % an Gesamtflavonoiden, berechnet als 5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1, ermitteln.

5,4'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavon 1



Die Isolierung des Flavons gelingt durch säulenchromatographische Trennung von Extrakt c auf Polyamid-S 6 im Elutionsmittel Methanol-Wasser (2:3).

hRF-Wert: 51 (Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure)

Detektion: UV (365 nm): dunkelrot

Bor-Oxalsäure: gelb

Schmp.: 225 °C

UV (MeOH), nm (log ε): 283 (4,28); 294 sh (4,26); 332 (4,39)

IR (KBr): 3520 - 3020 (m, OH verbrückt); 2960 und 2930 (m, CH); 2830 (m, OCH_3); 1655 (s, C=O); 1605, 1590, 1560 und 1500 (s, Aromat); 830 (s, 2 benachbarte H)

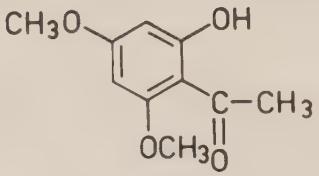
MS (142 °C) m/e: 344 (M^+, 70 %); 329 (100 %); 314 (5 %), 301 (3 %); 211 (13 %); 183 (12 %); 119 (16 %); 118 (5 %)

^{1}H-NMR (CD_3OD): 3,88 (s, OCH_3); 3,94 (s, OCH_3); 4,07 (s, OCH_3); 6,61 (s, H-3); 6,85 - 7,94 (m, 4 Ph-H, AA'BB')

^{13}C-NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 3:1): 61,36 (OCH_3); 61,90 (OCH_3); 62,39 (OCH_3); 103,18 (C-3); 107,09 (C-10); 116,46 (C-3' und C-5'); 122,20 (C-1'); 128,68 (C-2' und C-6'); 133,43 (C-6); 136,62 (C-8); 146,27 und 149,27 (C-5 und C-9); 153,25 (C-7); 161,67 (C-4'); 165,45 (C-2); 183,50 (C-4)

Synthese des 5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavons 10a

2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon 2

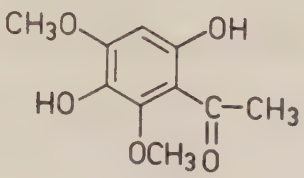


16,8 g (0,1 mol) 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (bei 120 °C getrocknet) werden in 40 ml Aceton gelöst und nach Zusatz von 150 ml Benzol, 40 g Kaliumcarbonat und 27,7 g (0,22 mol) frisch destilliertem Dimethylsulfat 12 Stunden lang unter Rückfluß und Rühren zum Sieden erhitzt. Nach Abtrennen der nicht gelösten anorganischen Salze wird das durch Schütteln mit Wasser gereinigte Filtrat viermal mit je 50 ml 5%iger Natriumhydroxidlösung extrahiert. Beim Eingießen des tief gelbgefärbten, alkalischen Extrakts in verdünnte Salzsäure fällt 2 feinkristallin aus. Der hellgelbe Niederschlag wird mit 5%iger Natriumcarbonatlösung digeriert, mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12,1 g (61 % d.Th.)

^{1}H-NMR (C_6D_6): 2,41 (s, OC-CH_3); 3,11 (s, OCH_3); 3,23 (s, OCH_3); 5,68 - 6,29 (m, 2 Ph-H); 14,62 (s, OH)

2,5-Dihydroxy-4,6-dimethoxyacetophenon 3

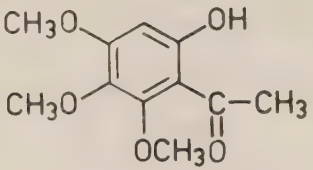


Die Suspension von 19,6 g (0,1 mol) 2 in 200 ml 10%iger Natriumhydroxidlösung wird bis zur Lösung der Substanz mit Pyridin versetzt. Zu der auf der Temperatur von 16 °C konstant gehaltenen Lösung (thermostatisiertes Wasserbad) werden über einen Zeitraum von 4 Stunden unter Rühren 29,7 g (0,11 mol) Kaliumpersulfat, in 300 ml Wasser gelöst, zugetropft. Nach 36stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird die Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH 5,7 eingestellt (pH-Meter). Das dabei ausfallende Ausgangsketon wird abgetrennt und das Filtrat nach Reinigung mit Tierkohle und Natriumsulfit mit 150 ml konzentrierter Salzsäure 30 Minuten lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Bei schnellem Abkühlen der Lösung fällt 3 in Form von gelbbraunen Kristallen aus. Ausschütteln des Filtrats mit Ether führt zu weiterem Produkt, das sich aus Ethanol umkristallisieren läßt.

Ausbeute: 6,8 g (32 % d.Th.)

^{1}H-NMR (CD_3COCD_3): 2,63 (s, OC-CH_3); 3,91 (s, OCH_3);
3,96 (s, OCH_3); 6,26 (s, H-3);
7,14 (bs, OH); 13,13 (s, OH)

2-Hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenon 4

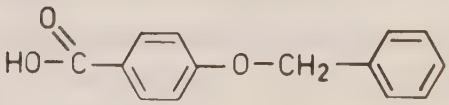


Analog der Verbindung 2 werden 2,12 g (0,01 mol) 3 mit 1,4 g (0,011 mol) Dimethylsulfat umgesetzt. Das gelbbraune Öl wird durch Aufnehmen in Petrolether gereinigt.

Ausbeute: 1,6 g (71 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 2,64 (s, OC-CH_3); 3,78 (s, OCH_3); 3,87 (s, OCH_3); 3,97 (s, OCH_3); 6,22 (s, H-3); 13,38 (s, OH)

4-Benzyloxybenzoesäure 5a



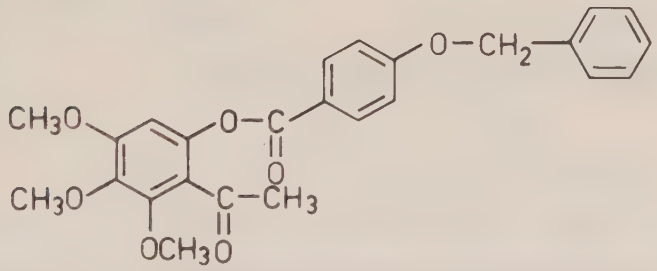
13,8 g (0,1 mol) 4-Hydroxybenzoesäure werden in einer Mischung aus 100 ml Ethanol und 50 ml 2N-Natriumhydroxidlösung gelöst und nach Zusatz von 37,8 g (3,0 mol) Benzyl-

chlorid unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Ohne das Sieden zu unterbrechen, werden über einen Zeitraum von 2 Stunden 200 ml 5N-Natriumhydroxidlösung hinzugetropft. Nach weiterem 1stündigem Erhitzen wird die Lösung auf die Hälfte ihres Volumens eingedampft und mit 200 ml Wasser verdünnt. Beim Ansäuern der noch warmen Lösung bilden sich farblose Kristalle, die aus Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 19,5 g (85 % d.Th.)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 5,16 (s, CH_2); 6,99 - 7,95 (m, 4 Ph-H, AA'BB'); 7,45 (s, 5 Ph-H).

2-(4'-Benzyloxybenzoyloxy)-4,5,6-trimethoxyacetophenon 6



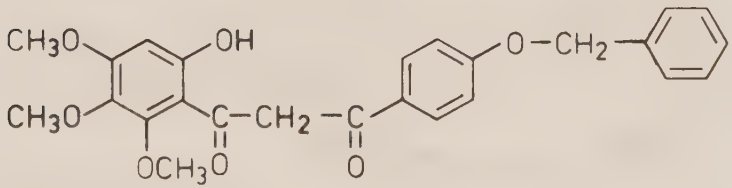
9,1 g (0,04 mol) 5a werden in 10 ml Thionylchlorid unter Rückfluß 30 Minuten lang zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wird am Rotavapor abgedampft und zu dem Rückstand eine Lösung von 9,0 g (0,04 mol) 4 in 75 ml Pyridin gegeben. Die Mischung wird 1/2 Stunde lang unter Rückfluß

erhitzt und die abgekühlte Lösung in eiskalte verdünnte Salzsäure geschüttet. Die farblosen Kristalle werden gesammelt und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 8,9 g (51 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 2,47 (s, OC-CH_3); 3,88 (s, OCH_3); 3,91 (s, OCH_3); 3,94 (s, OCH_3); 5,16 (s, O-CH_2-Ph); 6,56 (s, H-3); 6,98 - 8,14 (m, 4 Ph-H, AA'BB'); 7,40 (s, 5 Ph-H)

ω-(4'-Benzyloxybenzoyl)-2-hydroxy-4,5,6-trimethoxyacetophenon 7

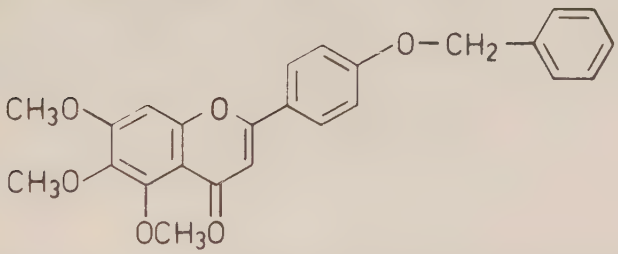


8,7 g (0,02 mol) 6 werden unter Zugabe von 1,7 g gepulvertem Natriumhydroxid in 40 ml Pyridin 1 Stunde lang bei konstant gehaltener Temperatur von 47 °C (thermostatisiertes Wasserbad) gerührt. Beim Einschütten der Lösung in eisgekühlte verdünnte Salzsäure scheiden sich gelbe Kristalle ab, die aus Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 5,4 g (62 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 3,76 (s, OC-CH_2-CO); 3,83 (s, OCH_3); 3,87 (s, OCH_3); 3,93 (s, OCH_3); 5,14 (s, O-CH_2-Ph); 6,29 (s, H-3); 6,95 - 7,97 (m, 4 Ph-H, AA'BB'); 7,40 (s, 5 Ph-H); 12,84 (s, OH).

4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxyflavon 8



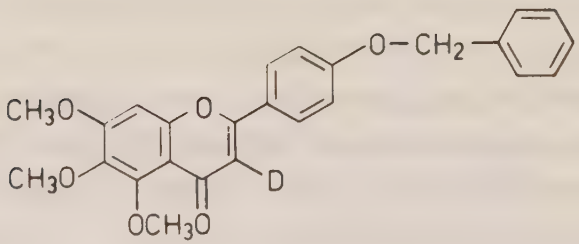
4,4 g (0,01 mol) 7 werden in einer Mischung aus 50 ml Eisessig und 10 g wasserfreiem Natriumacetat 4 Stunden lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Wasserstrahlpumpenvakuum abgezogen und der mit Wasser gewaschene Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es bilden sich farblose Kristallnadeln aus.

Ausbeute: 3,2 g (77 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 3,89 (s, OCH_3); 3,94 (s, OCH_3); 3,96 (s, OCH_3); 5,11 (s, O-CH_2-Ph); 6,54 (s, H-3); 6,76 (s, H-8); 6,99 - 7,83 (m, 4 Ph-H, AA'BB'); 7,38 (s, 5 Ph-H)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): 56,14 (OCH_3); 61,35 (OCH_3); 62,03 (OCH_3); 69,98 (O-CH_2-Ph); 96,14 (C-8); 106,82 (C-3); 112,61 (C-10); 115,05 (C-3' und C-5'); 123,82 (C-1'); 127,28 (C-2", C-6", C-3" und C-5"); 128,00 (C-4"); 128,50 (C-2' und C-6'); 136,06 (C-1"); 140,10 (C-6); 152,28 und 154,23 (C-5 und C-9); 157,40 (C-7); 160,81 (C-4'); 161,05 (C-2); 176,89 (C-4)

4'-Benzyloxy-5,6,7-trimethoxy-3-D-flavon 8a



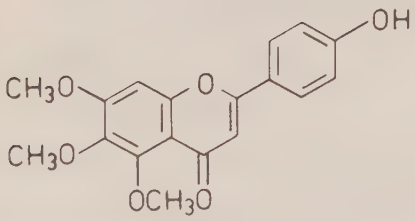
Analog der Verbindung 8 werden 0,09 g (0,0002 mol) 7 in 1 ml Essigsäure-d_4 und 0,5 g wasserfreiem Natriumacetat umgesetzt.

Ausbeute: 70 mg (83 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 3,88 (s, OCH_3); 3,93 (s, OCH_3); 3,96 (s, OCH_3); 5,09 (s, O-CH_2-Ph); 6,75 (s, H-8); 6,98 - 7,80 (m, 4 Ph-H, AA'BB'); 7,37 (s, 5 Ph-H)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): 56,14 (OCH_3); 61,35 (OCH_3); 62,03 (OCH_3); 69,98 (O-CH_2-Ph); 96,14 (C-8); 112,67 (C-10); 115,05 (C-3' und C-5'); 123,78 (C-1'); 127,28 (C-2", C-6", C-3" und C-5"); 128,00 (C-4"); 128,50 (C-2' und C-6'); 136,06 (C-1"); 140,10 (C-6); 152,29 und 154,28 (C-5 und C-9); 157,44 (C-7); 160,81 (C-4'); 161,05 (C-2); 176,93 (C-4)

4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavon 9



Eine Lösung von 1,1 g (0,0025 mol) 8 in 130 ml Ethanol wird mit 1,5 g Palladium-Kohle-Katalysator (10 % Pd), Merck, versetzt und 1 Stunde lang unter einem Druck von 1 bar Wasser-

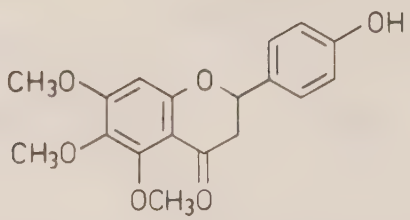
stoff in einem Hydriergerät der Fa. Kühn und Bayer geschüttelt. Nach Abtrennen des Katalysators wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Es bilden sich farblose Nadeln.

Ausbeute: 0,6 g (73 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 3,88 (s, OCH_3); 3,94 (s, OCH_3); 3,95 (s, OCH_3); 6,54 (s, H-3); 6,76 (s, H-8); 6,88 - 7,74 (m, 4 Ph-H, AA'BB')

^{13}C-NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 3:1):
56,16 (OCH_3); 61,36 (OCH_3); 61,98 (OCH_3); 96,19 (C-8); 105,70 (C-3); 112,20 (C-10); 115,87 (C-3' und C-5'); 121,95 (C-1'); 127,74 (C-2' und C-6'); 140,09 (C-6); 152,14 (C-5); 154,42 (C-9); 157,75 (C-7); 160,42 (C-4'); 162,24 (C-2); 178,03 (C-4)

4'-Hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanon 9a



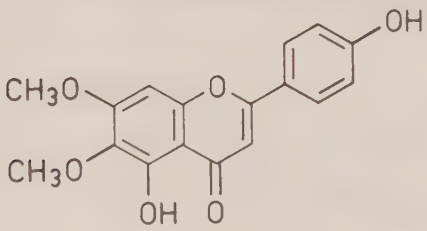
Die Darstellung des Flavanons erfolgt wie bei Verbindung 9; die Hydrogenolyse verläuft über 6 Stunden unter 2,5 bar Wasserstoff. Die farblose Substanz wird aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 0,16 g (19 % d.Th.)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 2,58 - 3,19 und 5,19 - 5,36 (m, H-2 und CH_2, ABX); 3,80 (s, OCH_3); 3,85 (s, OCH_3); 3,93 (s, OCH_3); 6,32 (s, H-8); 6,84 - 7,33 (m, 4 Ph-H, AA'BB')

^{13}C-NMR ($CDCl_3$): 45,27 (C-3); 56,16 (OCH_3); 61,38 (OCH_3); 61,64 (OCH_3); 79,16 (C-2); 96,41 (C-8); 109,03 (C-10); 115,69 (C-3' und C-5'); 127,87 (C-2' und C-6'); 130,35 (C-1'); 137,42 (C-6); 154,18 (C-5); 156,47 (C-4'); 159,61 (C-7); 159,95 (C-9); 190,07 (C-4)

5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10a



0,33 g (0,001 mol) 9 werden in 50 ml Ether unter Zusatz von 3 g wasserfreiem Aluminiumchlorid 10 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Beim Einschütten des Reaktionsgemisches in Eiswasser bildet sich ein gelber Niederschlag, der gesammelt und in einer Mischung aus 20 ml konzentrierter Salz-

säure und 30 ml Eisessig 30 Minuten lang unter Rückfluß zum Sieden erhitzt wird. Durch Verdünnen der Lösung mit Wasser scheiden sich gelbe Kristalle ab, die aus Methanol umkristallisiert werden.

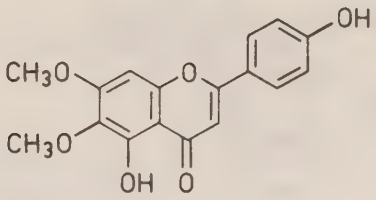
Ausbeute: 115 mg (37 % d.Th.)

Schmp. : 255 °C

^{13}C-NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 3:1):

56,46 (OCH_3); 60,98 (OCH_3); 91,10 (C-8); 103,35 (C-3); 106,04 (C-10); 116,24 (C-3' und C-5'); 122,19 (C-1'); 128,50 (C-2' und C-6'); 132,60 (C-6); 152,65 (C-5); 153,63 (C-9); 159,03 (C-7); 161,29 (C-4'); 165,27 (C-2); 183,07 (C-4)

5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon 10



Die Isolierung des Flavons gelingt durch Umkehrphasenchromatographie von Extrakt c auf Kieselgel 60 silanisiert (Merck) im Elutionsmittel Methanol-Wasser (1:1).

hRF-Wert: 49 (Toluol/Ethylformiat/Ameisensäure)

Detektion: UV (365 nm): dunkelrot

Bor-Oxalsäure: gelb

Schmp.: 256 °C

UV (MeOH), nm (log ε): 275 (4,23); 334 (4,41).

IR (KBr): 3120 (m, OH verbrückt); 3005 (w, C=C-H); 2960 und 2935 (m, CH); 2840 (m, OCH_3); 1655 (s, C=O); 1595, 1560, 1490 und 1455 (s, Aromat); 830 (s, 2 benachbarte H)

MS (168 °C), m/e: 314 (M^+, 100 %); 299 (88 %); 285 (29 %); 271 (39 %); 268 (32 %); 181 (36 %); 153 (61 %); 119 (31 %); 118 (12 %)

^{1}H-NMR (CD_3OD): 3,83 (s, C-6 OCH_3); 3,97 (s, C-7 OCH_3); 6,65 (s, H-3); 6,81 (s, H-8); 6,88 - 7,93 (m, 4 Ph-H, AA'BB')

IV. Literaturverzeichnis

1) R. Kono, A. Sasagawa, K. Ishii, S. Sugiura, M. Ochi, H. Matsumiya, Y. Uchida, K. Kameyama, M. Kaneko und N. Sakurai, Lancet 1, 1191 (1972)

2) R.R. Mirkovic, R. Kono, M. Yin-Murphy, R. Sohier, N.J. Schmidt und J.L. Melnick, Bull. Wld Hlth Org. 49, 341 (1973)

3) R. Sillans, Ann. pharm. franc. 11, 364 (1953)

4) A. Guillaumin, Bul. Sc. Pharmacol. 37, 431 (1930)

5) J.M. Watt und M.G. Breyer-Brandwijk, The Medicinal and Poisonous Plants of Southern Africa and Eastern Africa, 2. Auflage, E. & S. Livingstone LTD., Edinburgh und London 1962, S. 524

6) W.T. Thiselton-Dyer, Flora of Tropical Africa, Lovell Reeve & Co., London 1900, S. 337

7) Botanical Register, Vol. IX, London 1823

8) A. Engler und K. Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, Band IV/3a und 3b, Verlag Engelmann, Leipzig 1897, S. 369

9) J. Hutchinson und J.M. Dalziel, Flora of West-tropical Africa, Vol. II, Crown Agents 1963, S. 451

10) M. Wichtl, Die Pharmakognostisch-Chemische Analyse, Methoden der Analyse in der Chemie, Band 12, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main 1971

11) H. Böhme und K. Hartke, Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 7. Ausgabe 1968, 1. Auflage, Govi-Verlag, Frankfurt 1970, S. 92

12) H. Vollmer, Arch. Exptl. Pathol. und Pharmakol. 176, 207 (1934)

13) C.H. Brieskorn, Pharm. Acta Helv. 24, 51 (1949)

14) K. Herrmann, Arch. Pharm. 287, 142 (1954)

15) R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band IV, Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart 1966, S. 327

16) V.I. Litvinenko, T.P. Popova, A.V. Simonjan, I.G. Zoz und V.S. Sokolov, Planta medica 27, 372 (1975)

17) R.A. Cohen, L.S. Kucera und E.C. Herrmann, Proc. Soc. Exp. Biol. und Med. 117, 431 (1964)

18) K. Egger, in: Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch, Hrsg. E. Stahl, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 655

19) G. May und G. Willuhn, Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28, 1 (1978)

20) E.C. Herrmann und L.S. Kucera, Proc. Soc. Exp. Biol. und Med. 124, 869 (1967)

21) K. Venkataraman, in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Hrsg. L. Zechmeister, Band XVII, Springer-Verlag, Wien 1959, S. 5

22) J. Shinoda, J. Pharmac. Soc. Japan 48, 214 (1928)

23) C.W. Wilson, J. Amer. pharmac. Assoc. 61, 2303 (1939)

24) L. Hörhammer und R. Hänsel, Arch. Pharm. 288, 315 (1955)

25) T.J. Mabry, K.R. Markham und M.B. Thomas, The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970

26) R. Neu, Naturwissenschaften 44, 181 (1957)

27) M.K. Seikel, in: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Hrsg. T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1962, S. 34

28) L. Jurd in: The Chemistry of Flavonoid Compounds, Hrsg. T.A. Geissman, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1962, S. 107

29) J.J. Chirikdjian und W. Bleier, Sci. Pharm. 39, 65 (1971)

30) L. Hörhammer, H. Wagner und F. Gloggengießer, Arch. Pharm. 291, 126 (1958)

31) S.E. Drewes, Chroman and Related Compounds, Vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim 1974

32) C.S. Barnes und J.L. Occolowitz, Aust. J. Chem. 17, 975 (1964)

33) D.G.I. Kingston, Tetrahedron 27, 2691 (1971)

34) J.H. Bowie und D.W. Cameron, Aust. J. Chem. 19, 1627 (1966)

35) D.H. Williams und I. Fleming, Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 1975, S. 124

36) B. Ternai und K.R. Markham, Tetrahedron 32, 565 (1976)

37) A. Pelter, R.S. Ward und T.J. Gray, J.C.S. Perkin I 23, 2475 (1976)

38) J.B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy, Academic Press, New York und London 1972, S. 197

39) K.R. Markham und B. Ternai, Tetrahedron 32, 2607 (1976)

40) H. Wagner, V.M. Chari und J. Sonnenbichler, Tetrahedron Lett. 1966, 1799

41) Ching-jer Chang, J. Org. Chem. 41, 1881 (1976)

42) K. Fukui, T. Matsumoto und T. Kinoshita, Bull. Chem. Soc. Japan 37, 662 (1964)

43) V.D.N. Sastri und T.R. Seshadri, Proc. Indian Acad. Sci. 23A, 262 (1946)

44) K. Venkataraman, in: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Hrsg. L. Zechmeister, Band XVII, Springer-Verlag, Wien 1959, S. 35

45) N.V. Nowlan, P.A. Slavin und T.S. Wheeler, J. Chem. Soc. (London) 1950, 340

46) B. Christ und K.H. Müller, Arch. Pharm. 293, 1033 (1960)

47) R. Hänsel, Planta medica 10, 361 (1962)

48) G.H. Stout und V.F. Stout, Tetrahedron 14, 296 (1961)

49) J. Pinkas, D. Lavie und M. Chorin, Phytochemistry 7, 169 (1968)

50) N. Morita und M. Shimizu, J. Pharm. Soc. Japan 83, 615 (1963)

51) J.W. Wallace und B.A. Bohm, Phytochemistry 10, 452 (1971)

52) T.A. Geissman, R. Mukherjee und K.Y. Sim, Phytochemistry 6, 1575 (1967)

53) C.H. Brieskorn und W. Biechele, Tetrahedron Lett. 1969, 2603 und Arch. Pharm. 304, 557 (1971)

Lebenslauf

17. 05. 1950	geboren in Dortmund als Tochter des Studiendirektors i.R. Friedrich Sander und seiner Ehefrau Luise, geb. Funke
1.4.1956 - 31.3.1960	Besuch der Liebig-Schule in Dortmund
1.4.1960 - 30.6.1968	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Dortmund
24.5.1968	Abitur
1.7.1968 - 30.6.1969	Praktikum in der Apotheke der Städt. Krankenanstalten Dortmund
1.7.1969 - 30.6.1970	Praktikum in der Einhorn-Apotheke in Dortmund
10.6.1970	Pharmazeutische Vorprüfung in Arnsberg
ab WS 1970/71	Pharmaziestudium an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn
5.10.1973	Pharmazeutische Prüfung in Marburg
5.11.1973	Approbation als Apothekerin
SS 1974	Teilnahme an Fortgeschrittenen-Praktika für Doktoranden
1.8.1974	Beginn der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-H. Otto
seit 1.5.1976	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazeutische Chemie in Marburg

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Böhme, Dehnicke, Ebel, Fischer, Haake, Hartke, Kating, Koransky, Krieglstein, List, Nultsch, Otto, Schiff, Schmitz, Seitz, Unterhalt, Walcher, Wichtl, Willuhn